جامعة تشرين
كلية الزراعة
قسم البساتين



الإكثار الخضري الدقيق والتوصيف الجزيئي لنوع الزعرور *Crataegus azarolus*, L. المنتشر في ريف دمشق

رسالة علمية أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية

اختصاص بساتين

إعداد الطالب

جهاد موفق ضميرية

إجازة في الهندسة الزراعية من كلية الزراعة في جامعة دمشق عام 2000

دبلوم دراسات عليا في الهندسة الزراعية من كلية الزراعة في جامعة دمشق عام 2001

بإشراف

الدكتور مروان حميدان
أستاذ في كلية الزراعة – قسم البساتين
جامعة تشرين

الدكتور أحمد عبد القادر
رئيس قسم التقانات الحيوية
الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – دوما

العام الدراسي
2009 - 2008

قُدّمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية – اختصاص بساتين من كلية الزراعة في جامعة تشرين

This thesis has been submitted as a partial fulfillment of the requirement for the degree of Master in Agricultural Engineering, (Horticulture) at the Faculty of Agriculture, Tishreen University.

تصريح

أُصرّح بأنّ هذا البحث " **الإكثار الخضري الدقيق والتوصيـف الجزيئـي لنـوع الزعـرور *Crataegus azarolus*, L. المنتشر في ريف دمشق** " لم يسبق أن قُبل للحصول على شـهادة ولا هو مُقدّم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

جهاد موفق ضميرية

تاريخ: 15 / 8 /2008

DECLERATION

This is to declare that, this work " ***In vitro* propagation and molecular characterization of Hawthorn species (*Crataegus azarolus*, L.) in Damascus countryside** " has not been submitted concurrently for any other degree.

Jehad Mowafak Dumireih

Date: 15 / 8 /2008

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 4 / 11 / 2008 وأُجيزت.

لجنة الحكم:

الأستاذ الدكتــــور مروان حميدان

أستاذ الخضار وزراعة الأنسجة في قسم البساتين من كلية الزراعة بجامعة تشرين

الدكتورة وفاء شومان

أستاذة في قسم العلوم الأساسية، اختصاص وراثة جزيئية و تقانات حيوية من كلية الزراعة بجامعة تشرين

الدكتور بسام الصفدي

رئيس دائرة التقانات الحيوية في هيئة الطاقة الذرية، اختصاص زراعة أنسجة نباتية

كلمة شـــكر

ACKNOWLEDGMENT

أتقدم بجزيل الشكر لجامعة تشرين ممثلة برئيسها الأستاذ الدكتور **محمد معلا**، و لكلية الزراعة بجامعة تشرين بشخص عميدها الأستاذ الدكتور **سمير جراد**، ولنائب عميد الكلية للشؤون العلمية الأستاذ الدكتور **متيادي بوراس** لدعمهم اللا محدود لتسهيل وتشجيع طلاب الدراسات العليا والبحث العلمي، و تكريس التعاون العلمي مع الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية الذي لولاه لما أتيحت الفرصة لهذا البحث أن يرى النور.

كما أتقدم أيضاً بخالص الشكر لرئيس قسم البساتين بكلية الزراعة والمشرف العلمي الأستاذ الدكتور **مروان حميدان** للمساعدة الجمة في إنجاز هذا العمل وتصحيحه، وتدقيق هذه الأطروحة وإغنائها، ودعمه وتشجيعه المستمر ومعاملته الأبوية، ولأعضاء الهيئة التدريسية في قسم البساتين كافة لتوجيهاتهم القيمة خلال مراحل تنفيذ هذه الدراسة.

والشكر أيضاً للأستاذة للدكتورة **وفاء شومان** رئيسة قسم العلوم الأساسية في كلية الزراعة بجامعة تشرين، لملاحظاتها وتوجيهاتها القيمة في مجال التوصيف الجزيئي والتي ساهمت في إغناء هذا العمل.

والشكر الجزيل لهيئة الإشراف العلمي الأستاذ الدكتور **مروان حميدان** من كلية الزراعة بجامعة تشرين والدكتور **أحمد عبد القادر** رئيس قسم التقانات الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية على توجيهاتهما وإرشاداتهما القيمة وتقديمهما كافة التسهيلات الممكنة لاستكمال انجاز هذه الدراسة ولمعاملتهما الحسنة.

كما أقدم العرفان بالجميل أيضاً، للأساتذة **أعضاء لجنة الحكم**، لجهدهم الكبير في تقييم هذا البحث واغنائهم له.

وبفيض من الاحترام، أتقدم بوافر الشكر والتقدير إلى الســــيد وزير الزراعة والإصلاح الزراعي الأستاذ الدكتور **عادل سفر** لإتاحته الفرصة للعاملين في الوزارة – الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – لمتابعة تحصيلهم العلمي.

وخالص الشكر والتقدير للأستاذ الدكتور**محمد وليد طويل** مدير عام الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية لتشجيعه المستمر، واهتمامه بأمور البحث العلمي، وتوفيره التسهيلات المتاحة للباحثين لمواصلة درب العلم والمعرفة.

كما لا أنسى التقدم بالشكر للأستاذ **الدكتور مجد جمال** المدير العام السابق للهيئة لتقديمه التسهيلات اللازمة للتسجيل للماجستير وتسهيل توفير مستلزمات هذا العمل.

كما أتقدم بالشكر لكافة العاملين في قسم التقانات الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية بدمشق لما بذلوه من مساعدة وتشجيع معنوي أثناء تنفيذ هذا البحث.

كما أتقدم بالشكر أيضاً، لمؤسسة الكسندرفون هامبولد الألمانية Alexander von Humboldt Stiftung, Germany ، لتقديمها أجهزة عديدة كمنحة لقسم التقانات الحيوية في الهيئة، والتي استخدمت في هذا العمل وخاصة الأجهزة المستخدمة في التوصيف الجزيئي.

وكل المحبة **لعائلتي** الكريمة (والدي الغالي، والدتي الحنونة، إخوتي الأعزاء) لدعمهم المستمر لي لمتابعة تحصيلي العلمي.

ومن عميق قلبي أشكر خطيبتي الغالية **ملك** مع خالص المحبة والتقدير، لتشجيعي المستمر ومساندتي لإنجاح هذا العمل.

جهاد موفق ضميرية

الإهداء

إلى وطني الغالي

إلى كل إنسان مخلص في عمله

إلى كل العاملين في البحث العلمي في سبيل خير ومنفعة الإنسان وتطوير بلدنا وازدهاره

إليـــكم جــميعاً أهـــدي ثـــمرة عملـــي المتواضـــع

جهاد

شهادة

نشهد بأنّ هذا العمل الموصوف في هذه الرسالة " **الإكثار الخضري الدقيق والتوصيف الجزيئي لنوع الزعرور** ***Crataegus azarolus*, L.** **المنتشر في ريف دمشق**" هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح السيد جهاد موفق ضميرية بإشراف الدكتور مروان حميدان (الأستاذ في قسم البساتين من كلية الزراعة بجامعة تشرين، اللاذقية، سورية) والدكتور أحمد عبد القادر (رئيس قسم التقانات الحيوية، الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، دمشق، سورية)، **وإنّ أي مرجع ورد في هذه الرسالة موثّق في النص.**

المُرشّح	بإشراف	
جهاد موفق ضميرية	**أ.د.مروان حميدان**	**د.أحمد عبد القادر**

تاريخ: 15 / 8 /2008

CERTIFICATION

It is hereby certified that, the work described in this thesis "*In vitro* propagation and molecular characterization of Hawthorn species (*Crataegus azarolus*, L.) in Damascus countryside" is the results of Mr.Jehad Dumireih own investigations under the supervision of Dr.Marwan Homedan (Prof. in Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Tishreen University, Lattakia, SYRIA), and Dr.Ahmad M. Abdul Kader (Head of Biotechnology Department - General Commission for Scientific Agricultural Research, Biotechnology Department, Damascus, SYRIA), and any reference of other researchers work has been duly acknowledged in the text.

Candidate	Supervisors	
Jehad Dumireih	Prof. Dr. Marwan Homedan	Dr.Ahmad Abdul Kader

Date: 15 / 8 /2008

فهـرس المحتـويات

فهرس الجداول

فهرس الأشكال

المقدمة

يعتبر التنوع الحيوي والوراثي كنزاً ثميناً يضمن استمرار الحياة على وجه البسيطة وأمام الطلب المتزايد على الغذاء والدواء لسكان الأرض، فإنه من الضروري حفظ واستثمار المصادر الوراثية، بهدف رفع إنتاجية المحاصيل المختلفة وزيادة قدرتها على تحمل الإجهادات الحيوية واللاحيوية المختلفة، وخصوصاً الجفاف بفعل تغير المناخ. لذلك تعتبر صيانة الموارد الوراثية النباتية والاستخدام المستدام لها، عنصرين رئيسين لتحسين الإنتاجية والمساهمة في تحقيق الأمن الغذائي.

يمتلك الوطن العربي بموقعه المتوسط في العالم أهمية خاصة، نظراً لوجود العديد من المصادر الوراثية النباتية، والتي لا يزال الكثير منها موجوداً في حقول المزارعين وفي البراري، إلا أن هذه الموارد مهددة بالتدهور مالم تبذل الجهود لصيانتها والمحافظة عليها.

وتعد الجمهورية العربية السورية مهداً غنياً بالمصادر الوراثية البرية والمزروعة لعدد كبير من الأنواع النباتية، فهي تضم طبيعياً حوالي 3500 نوع نباتي منها 243 نوعاً متوطناً تتوزع معظمها في الجبال والمرتفعات.

ويعتبر الزعرور من الأصول الوراثية المهمة للأشجار المثمرة في البيئة السورية إضافة إلى اللوز البري، الزيتون البري، البطم، خوخ الدب، الكمثرى البرية، والتي تنتشر في الأراضي الصخرية والكلسية، كما أنها تنمو على ارتفاعات مختلفة تصل حتى ارتفاع 1800 متر عن سطح البحر، يشاهد بعضها في مناطق تغطيها الثلوج لعدة أشهر دون أن يظهر عليها أي ضرر، ويتواجد البعض الآخر في بيئات جافة متأقلماً ومتحملاً لإجهادات شديدة القسوة، وهذا يدل على وجود مخزون وراثي كبير مسؤول عن الصفات المرغوبة فيها، مما يجعلها قادرة على تحمل مدى واسع من الظروف البيئية شديدة التباين، كالجفاف والبرودة وارتفاع نسبة الملوحة والكلس في التربة.

تتبع أنواع الزعرور إلى الجنس (*Crataegus*)، وتحت الفصيلة التفاحية، والفصيلة الوردية (*Rosaceae*) (Townsensend and Guest, 1966)، ويضم جنس الزعرور حوالي 100 نوع في المناطق الشمالية من العالم القديم وعدة مئات من الأنواع في أمريكا الشمالية (Zohary, 1972)، كما ذكر أن جنس الزعرور يضم حوالي150 إلى 1200 نوعاً موزعةً بشكل أساسي في المناطق المعتدلة، منها حوالي 100 إلى 1100 نوع توجد في المناطق المعتدلة من أمريكا الشمالية، وحوالي 50 إلى 100 نوع في المناطق المعتدلة من العالم القديم في أوروبا، شمال أفريقيا، غرب آسيا، وغيرها (Christensen, 1992).

أشارت بعض الدراسات إلى وجود وانتشار بعض أنواع الزعرور في سورية، فقد أشار (Boissier, 1872) في فلورة المشرق إلى وجود ثلاثة عشر نوعاً تتبع الجنس Crataegus ينتشر البعض منها في سورية ولبنان وفلسطين ومصر وهي:

C. azarolus, C. sinaicai, C. oxycantha , C. monogyna , C . laciniata, C. orientalis, C. tanacetifolia , C. pycnoloba , C. melanocarpa, C. heldreichii, C. heterophylla, C. pectinata, C. lagenaria.

وذكر(Post, 1896) وجود خمسة أنواع تتبع الجنس *Crataegus* تتوزع في كل من سورية وفلسطين ولبنان والأردن وهي:

C . monogyna, C. oxycantha , C. sinaicai , C. azarolus , C. orientales، كما أشار (Mouterde, 1966) إلى وجود ثلاثة أنواع من الزعرور تنتشر في كل من سورية ولبنان وفلسطين وتركيا وقبرص والعراق وإيران هي:

C. azarolus , C. monogyna , C. sinaicai، ولاحظ (Pabot, 1956) وجود النوع *C. azarolus* في جبل العرب في سورية، كما ذكر(Zohary, 1972) وجود الأنواع التالية: *C. azarolus , C. monogyn* , *C. azarolus var. aronia* في كل من سورية ولبنان وتركيا والعراق وإيران وقبرص ومصر وفلسطين، كما أشار (Townsend and Guest, 1966) إلى وجود أربعة أنواع من الزعرور منتشرة في العراق وسورية ولبنان وتركيا هي:

C. Azarolus , C . monogyn , C . pentagyna C . meyeri، كمـــا أشـــار (Rechinger, 1969) إلـــى وجود 21 نوعاً من الزعرور منها:

C. sinaicai , C. orientalis, C. azarolus , C. piiatifida يتوزع بعـــضها فـــي ســـورية والعـــراق وفلسطين ولبنان والأناضول وأفغانستان وباكستان وإيران .

أما محلياً، فقد أشار (مزهر، 1998) إلى وجود نوعين فـــي محافظـــة الـــسويداء همـــا: *C.azaralus* و *C.sinaica* كما تبين وجود نوعي الزعرور *C. azarolus* و *C. monogyna* في محافظة ريف دمشق (ضميرية، 2001)، و أشارت (ريا، 2006) إلى وجود النـــوعين الـــسابقين فـــي محافظة اللاذقية، كما يتواجد الزعرور مترافقاً مع الإجاص البري السوري في بعـــض أمـــاكن انتشاره في سورية (فلوح، 1990) .

إن البحث عن التباينات الوراثية والتعرف عليها داخل هذه المصادر المهمة له أهمية كبيرة في توسيع القاعدة الوراثية لها، والتي تعتبر الخطوة الأولى في عملية التحسين الوراثي لذلك كان لابد من توصيف هذه المصادر وتصنيفها وإكثارها ومن ثم نقلها إلى المجمعات الوراثية لاستثمارها كأصول برية يمكن التطعيم عليها مستقبلاً أو إدخالها كمادة وراثية في برامج التحسين الوراثي، بهدف استنباط أصناف جديدة ذات مردود اقتصادي جيد.

من جهة ثانية، تعد عملية توصيف وتصنيف الأنواع البرية للأشجار المثمرة اعتماداً على الصفات الشكلية (المورفولوجية) والإنتاجية غير كافية لتحديد التباينات الوراثية، كما يعتبر إكثار بعض الأنواع النباتية بالطرائق العادية (إكثار بذري) عملية صعبة وغير فعالة، مما يعيق عملية استثمار هذه المصادر الوراثية الهامة.

من هنا تبرز أهمية استخدام طرائق التقانة الحيوية، التي يمكن بوساطتها التغلب على الكثير من المشاكل التي تواجه الباحثين في مجال الزراعة، حيث يشهد العالم اليوم ما يعرف بثورة التقانات الحيوية، التي تستخدم لإتمام عملية التوصيف الوراثي باستخدام طرائق البيولوجيا الجزيئية والتي يمكن بواسطتها تحديد التباينات الوراثية ودرجة القرابة الوراثية بين وضمن الأنواع النباتية والتوثيق الوراثي للطرز البرية المتميزة. كما تستخدم تقنيات حيوية أخرى كالإكثار الخضري الدقيق للتغلب على المشاكل التي تظهر عند استخدام طرق الإكثار العادية إضافة إلى تقنيات أخرى مثل التطعيم الدقيق والتحوير الوراثي للنباتات، وغير ذلك من هذه التقانات.

من جهة ثانية، يعتبر الزعرور من المصادر الوراثية المهمة، والتي يمكن استثمارها لأغراض عديدة، فهو يستخدم كأصل لبعض الأشجار المثمرة كالتفاح والأجاص، نظراً لتحمله للظروف البيئية الصعبة، كما يزرع كشجرة، أو سياج للحدائق، إضافة إلى قيمته الطبية والغذائية. وينتشر الزعرور في سوريا في العديد من المناطق. ولكن، تعاني شجرة الزعرور في سورية من عدة مشاكل أهمها :

1). تعرض بعض أنواع الزعرور البرية إلى خطر الانقراض والتدهور، نتيجة لظاهرة التعرية الوراثية، أي فقدان التنوع الوراثي، والذي ينتج عن مجموعة من العوامل من أهمها: النشاطات الإنسانية المختلفة مثل: القطع والرعي الجائر والزحف السكاني واستصلاح الأراضي، وهذا ما حصل لأنواع الزعرور المنتشرة في محافظة درعا (مزهر، 1998).

2). عدم كفاية التوصيف الشكلي (المورفولوجي) في تحديد التباينات الوراثية بين الأنواع وداخلها، وقد ظهر ذلك جلياً في تصنيف جنس الزعرور كمشكلة مطروحة على مستوى عالمي وهذا ما أكده (Phipps, 1998)، ومن هنا تتجلى أهمية التوصيف الجزيئي لأنواع الزعرور.

3). صعوبة الإكثار الجنسي للزعرور وذلك لتدني نسب إنبات البذور، لوجود سكون مضاعف فيها ناتج عن السكون الفيزيولوجي للجنين، بالإضافة إلى وجود غلاف كتيم يمنع إنبات البذور.

ومن هنا تظهر أهمية البحث في ايجاد طرائق أخرى للإكثار السريع مثل الإكثار الخضري الدقيق الذي يساعد في حفظ ونشر زراعة هذا النبات الهام من الناحية الاقتصادية والبستانية.

أهداف البحث

يهدف البحث إلى :

1- إيجاد طريقة مناسبة لإكثار الزعرور *Crataegus azarolus,* L. بتقنيات زراعة الأنسجة النباتية وتحديد الشروط المثلى من خلال تحديد :

- الطريقة المناسبة للتعقيم السطحي للأجزاء النباتية المستخدمة في الزراعة التأسيسية بما يحقق أقل نسبة من التلوث، وتأسيس الزراعات الأولية.
- الوسط الغذائي المناسب والإضافات اللازمة من منظمات النمو للحصول على أكبر عدد من النموات الخضرية، وزيادة معدل الإكثار.
- الوسط الغذائي المناسب و الإضافات اللازمة من منظمات النمو لتشكل الجذور على النموات الخضرية.
- الشروط المثلى لتقسية النباتات المجذرة تمهيداً للزراعة الحقلية.

2- التوصيف الجزيئي لبعض الطرز البريـــة التابعة للزعرور *C. azarolus,* L. المنتشرة في ريف دمشق باستخدام تقنية RAPD ، و تحديد درجة القرابة الوراثية بينها.

الفصل الأول
الدراسة المرجعية

1- الأهمية الطبية والزراعية للزعرور:

أثبتت الأبحاث والدراسات وجود فوائد طبية عديدة للزعرور وخاصة في معالجة أمراض القلب وفقر الدم (Kao *et al.*, 2005) بالإضافة لاستخدامه كمضاد للالتهابات (Hosseinmehr *et al.*, 2007). وتعود أهميته الطبية لاحتوائه على نسب مرتفعة من المواد الفينوليية (Bahorun *et al* ., 1994) و مضادات الأكسدة (Rakotoarison *et al.* 1997).

كما يمتاز الزعرور بأهمية زراعية خاصة، فهو يتحمل الجفاف و يصلح للزراعة في الأراضي المحجرة (قطنا، 1988)، كما يتحمل ارتفاع نسبة الكلس في التربة (محفوض، 1982) ويتحمل الشتاء البارد والصقيع ويتواجد في الارتفاعات العالية حتى 1800 متر فوق سطح البحر (مزهر، 1998).

وتشير الدراسات إلى إمكانية استخدام الزعرور كأصل للكمثرى (الصنف وليامز) والتفاح (الصنف غولدن ديلسشس) (Qrunflch, 1994) ، كما أن هناك محاولات ناجحة لاستخدام النوع *C. azarolus* كأصل للكمثرى (الصنف كوشيا) واستخدام النوع *C. sinaica* كأصل للصنف ويليامز، إضافة لاستخدامه كأصل لتطعيم الأنواع المحسنة من الزعرور (مزهر، 1998).

2- طرائق إكثار الزعرور:

2-1- الطرائق التقليدية لإكثار الزعرور:

هناك العديد من الأبحاث والدراسات العالمية حول إكثار الزعرور بالطرائق التقليدية، ففي مجال إكثار الزعرور بالعقل، تبين أن زراعة عقل ساقية متخشبة يؤدي إلى انخفاض القدرة على التجذير، حيث لم تتجاوز نسبة التجذير 10 % (Bush, *et al*. 1991)، بينما أدى استخدام العقل الغضة المعاملة بمزيج من (NAA-IBA -K) إلى زيادة نسبة التجذير إلى35% (Payne *et al.*, 1990).
كما أثبتت الأبحاث حول إكثار الزعرور بالتطعيم أن التطعيم بالبرعم يعطي نتائج جيدة على أن يكون الطعم والأصل مأخوذان من الموطن الأصلي نفسه (Dirr and Heuser, 1987).

أما في مجال الإكثار البذري، فقد أجريت العديد من الدراسات لتحسين إنبات بذور الزعرور. و تبين أن نقع البذور(بعد نزعها مباشرة من الثمار) بحمض الكبريت المركز يؤدي إلى إحداث ضرر للجنين، وأنه من الأفضل الانتظار عدة أسابيع قبل المعاملة (Mahlsted and Harbr, 1975)، و أكد (Brinkman, 1974) على أهمية تنضيد بذور الزعرور بوجود حرارة منخفضة من أجل تحسين الإنبات، و تبين وجود طور سكون في البذور ناتج عن وجود

الغلاف البذري الكتيم، وظروف تتعلق بالجنين أيضاً، ووجد أنه من أجل تسريع الإنبات، يجب تنضيد البذور النظيفة والطازجة في طبقات من البيتموس لمدة 3 – 4 أشهر على حرارة 21– 27 م° أو معاملة البذور بحمض الكبريت المركز لمدة نصف ساعة، ومن ثم تنضيد البذور لمدة 5 أشهر على درجة حرارة 4 م°، و وجد أن البذور غير المعاملة تحتاج إلى 2– 3 سنوات كي تنبت (Harthman, 1975). وقد تحسنت نسبة إنبات البذور عند تطبيق مزيج من المعاملات عليها مثل: المعاملة بالحمض لفترة طويلة، خفض درجة حرارة غرفة التنضيد، إطالة فترة التنضيد البارد (Tipton and Pedroza, 1986).

وأشار (Baker, 1991) إلى تحسن نسب إنبات البذور عند استخدام طريقة تخمير الثمار دون إجراء عملية التنضيد للبذور. كما أشارت النتائج التي توصل إليها (Young and Young, 1992) إلى ضرورة التنضيد البارد لبذور الزعرور من أجل تحسين نسبة إنباتها. وبين (Harthmann *et al.*, 1997) أن خدش البذور ومعاملتها بالحمض مع التنضيد البارد لمدة 5 أشهر يحسن إنبات البذور، كما أشار إلى أن بذور الكثير من أنواع الزعرور تمر بمرحلة سكون مضاعف. وفي دراسة حول تأثير بعض العوامل في كسر طور سكون البذور لثلاثة أنواع من الزعرور، تبين أن نجاح إنبات البذور يتطلب تعريضها لدرجة حرارة دافئة لفترة لا تقل عن 60 يوماً، ثم تعريضها لدرجة حرارة منخفضة لفترة 120 يوماً أو أكثر، كما لوحظ اختلاف استجابة بذور أنواع الزعرور المدروسة للمعاملة بالحمض من أجل تحسين نسبة إنباتها (Morgenson, 2000). كما قام (Hazin *et al.*, 2006) بدراسة تأثير مواعيد زراعة بذور نوعين من الزعرور في نسبة إنباتها، ووجد أن أفضل موعد للزراعة هو بداية تشرين أول مع التأكيد على ضرورة التنضيد البارد للبذور قبل زراعتها.

أما بالنسبة للدراسات التي أجريت محلياً حول إكثار الزعرور بالطرائق التقليدية، فقد أشار (مزهر، 1998) إلى أن بذور الزعرور تتميز بطور سكون طويل ناتج عن السكون الفيزيولوجي للجنين، بالإضافة إلى وجود غلاف كتيم يمنع إنبات البذور، وتبين أن إنبات بذور نوعي الزعرور *C. azaralus, C. sinacia* المنتشرين في محافظة السويداء كان صعباً وكانت نسبة إنباتهما منخفضة (8 و 6 % على التوالي)، و قام (العيسى وجمال، 2004) بدراسة بعض العوامل المؤثرة في تجذير العقل وإنبات البذور لبعض أنواع الزعرور المحلية، وقد بلغت أفضل نسبة تجذير 20% عند معاملة العقل المتخشبة للنوع الإيطالي *C. azarolus Borkh* بهرمون حمض الأندول بيوتريك IBA تركيز 4000 جزء بالمليون، كما تبين أن أفضل نسبة لإنبات بذور الزعرور *C. oxycantha, L* كانت 5% عند معاملتها بحمض الكبريت تركيز 3% لمدة 6 ساعات.

2-2- إكثار الزعرور بزراعة الأنسجة النباتية:

بينت النتائج التي توصل إليها (Margaret and Colin, 1986) أن أفضل وسط مغذي لإكثار النوع *Crataegus brachyantha Sarg* باستخدام البراعم الجانبية هو وسط LS (Linsmeir and Skoog) المحتوي على البنزيــل أدينيــن BA بتركيز 1 ملغ/ليتر .

ولدى إكثار نوع الزعرور *C. scabrifolia* تبين أن البراعم الجانبية أعطت تفرعات بشكل أفضل من زراعة البراعم الطرفية وذلك عند استخدام وسط مغذي MS (Murashige and Skoog) يحتوي BA بتركيز 1-2 ملغ/ليتر و الإندول أسيتيك أسيد IAA بتركيز 0.5-1 ملغ/ليتر، و بلغت نسبة تجذير النموات 80% عند استخدام وسط تجذيرMS يحتوي على الإندول بيوتريك أسيد IBA أو IAA بتركيز 0.05-1 ملغ/ليتر (Hong et al ., 1987).

ووجد (Picconi and Standardi, 1995) لدى إكثار نوع الزعرور *C. oxycantha* إمكانية الحصول على معدل إكثار من 2-3 نموات عند الزراعة على وسط مغذي MS يحتوي علــى BA بتركيــز 0.5 ملغ/ليتر وســلفات الأدينين بتركــيز 1 ملغ/ ليتر وقام (Marks and Simpson 1999) , بإكثار النوع السابق باستخدام وسط مغذي LS يحتوي على BA بتركيز 2.5 µM و IBA بتركيز 0.5 µM . بينما وجد (Rajesh and Bist , 2002) أن أفضل وسط مغذي هو وسط MS المحتوي على BA بتركيز 2 ملغ/ليتر و IBA بتركيز 0.02 ملغ/ليتر، وكان أفضل وسط للتجذير هو وسط 1/2 MS المحتوي على IBA بتركيز 0.2 ملغ/ليتر و NAA بتركيز 0.2 ملغ / ليتر .

وبينت النتائج التي توصل إليها (Wawrosch *et al.*, 2007) أن تقنية الإكثار الخضري الدقيق للزعرور *Crataegus monogyna Jacq* باستخدام البراعم الخضرية الجانبية أفضل و أسرع من طريقة الإكثار التقليدية بالعقل، وقد تم إكثار النوع المذكور بزراعة البراعم الخضرية الجانبية التي جمعت من أشجار بالغة في فصل الربيع بعد تعقيمها سطحياً على بيئة MS المحتوية على الزياتين بتركيز 10 µM، بعد ذلك زرعت النموات القمية للفروع النامية على بيئة MS المحتوية على BA وIBA، وبهدف التجذير غمست قواعد النموات الخضرية بمسحوق التجذير Seradix® B3، ثم زرعت في التربة داخل حاضنات رطبة، ثم نقلت إلى البيت الزجاجي لمتابعة عملية التقسية.

كما قام (Shizhou *et al.*, 1987) بدراسة بعض العوامل المؤثرة في تجذير الزعرور *C. scabrifolia* المكاثر بالأنسجة، حيث بلغت نسبة التجذير 50% عند زراعة النموات في وسط 1/2MS، مضافاً له IBA أو NAA بتركيز 0.01-1 ملغ/لتر، بينما ارتفعت نسبة التجذير إلى 60% عند غمس النموات لمدة 30 ثانية في محلول يحتوي تركيز مرتفع من الأوكسين 150-250 ملغ/لتر

ومن ثم الزراعة في وسط 1/2MS، خالي من الأوكسين، بينما وصلت نسبة التجذير إلى 83% عند الغمس بمحلول الأوكسين لمدة 1 – 2 دقيقة، كما تبين أن زراعة النموات في وسط 1/2MS يحتوي على IBA بتركيز 1 – 5 ملغ/لتر لمدة 2 – 4 أيام ثم نقلها وزراعتها في الوسط نفسه بدون هرمونات لمدة 15 يوماً، يؤدي إلى زيادة نسبة التجذير إلى 92% مع استطالة طبيعية للجذور.

واستطاع (Haapla, 2004) باستخدام تقنية التحوير الوراثي التغلب على مشاكل تجذير الأنواع الخشبية المكاثرة نسيجياً ومنها الزعرور وذلك بنقل مورثة الـ Rol-gene بواسطة بكتريا *Agrobacterium rhizogenesis* إلى النبيتات النسيجية مما أدى إلى تحسين نسبة التجذير و زيادة عدد الجذور والمسطح الجذري.

وقد تمكن (Dai *et al.*, 2007) من الإكثار النسيجي لأوراق الزعرور *Crataegus pinnatifida*، وبينت النتائج أن أفضل وسط مغذي لتشكل البراعم من الأوراق هو وسط MS مضافاً له BA بتركيز 4.44 µM و TDZ بتركيز 9.08 - 4.54 µM، وكان أفضل وسط مغذي لتطور البراعم إلى أفرع هو وسط B_5 مضافاً له BA بتركيز 2.22 µM، والكينيتين بتركيز 2.32 µM و IAA بتركيز 0.57 µM، وكانت طريقة التجذير على مرحلتين هي الأفضل، ففي المرحلة الأولى تزرع النموات بطول 2 سم في وسط 1/2MS مضافاً له IBA بتركيز 19.68 µM لمدة 4 أيام، وفي المرحلة الثانية تنقل النموات إلى ذات الوسط بدون هرمونات، و كانت نسبة التجذير 50% ونسبة نجاح التقسية 80% .

يعتبر تأسيس الزراعات المعقمة من أهم مراحل الإكثار المخبري وأكثرها صعوبة بسبب مشكلتي التلوث والاسمرار البني في وقت واحد. فقد أشار (Modgil *et al.*, 1999) عند إكثاره لأحد أصناف التفاح نسيجياً أن مشكلة الاسمرار والتلوث من المشاكل الرئيسة في زراعة الأنسجة التي تظهر عادة في مرحلة الزراعة التأسيسية، حيث يعتمد نجاح هذه المرحلة على الوقت الذي يتم فيه جمع المادة النباتية خلال العام، وقد بينت نتائجه أن نسبة التلوث والإسمرار في مرحلة الزراعة التأسيسية كان منخفضاً وذلك عند زراعة المادة النباتية التي تم جمعها خلال الربيع والصيف مقارنة مع فصلي الشتاء والخريف، كما أن استجابة النبات للنمو كانت أفضل وأسرع وقد تم الحصول على نفس النتائج أيضاً من قبل (Webster and Jones, 1991) عند إكثاره لمجموعة من أصول التفاح نسيجياً.

هناك بعض الدراسات المرجعية التي أكدت على أهمية استخدام البراعم الجانبية في الزراعة التأسيسية للزعرور، فقد بينت النتائج التي توصل إليها (Wawrosch *et al.*, 2007) لدى إكثاره لنوع الزعرور *Crataegus monogyna Jacq* أهمية استخدام البراعم الجانبية كمادة

نباتية لتأسيس الزراعات المعقمة، حيث تم إكثار النوع المذكور باستخدام البراعم الخضرية الجانبية التي تم جمعها من أشجار بالغة في فصل الربيع ثم تعقيمها سطحياً وزراعتها في بيئة MS . ولدى إكثار نوع الزعرور *C. scabrifolia* بواسطة زراعة الأنسجة، تبين أن البراعم الجانبية أعطت تفرعات بشكل أفضل من زراعة البراعم الطرفية (Hong *et al.*, 1987).

تختلف طرائق التعقيم السطحي للمادة النباتية في النباتات المكاثرة نسيجياً، فقد بين (Skrvin, 1981) أن طرائق التعقيم السطحي للمادة النباتية في الزراعة التأسيسية عند إكثار أصناف التفاح نسيجياً ليست واحدة. وعموماً، يستخدم هيبوكلوريت الصوديوم في تعقيم المواد النباتية لتأسيس زراعات أنسجة سليمة في كثير من النباتات. وهناك أبحاث عديدة تشير إلى أهمية استعمال هيبوكلوريت الصوديوم NaOCl في التعقيم السطحي للمادة النباتية مثل الدراسات التي قام بها (Pevalek-Kozlina and Jelaska, 1987)، ووجد (Okamura *et al.*, 1999) في دراسته حول إكثار نوع الزعرور *Crataegus cuneata* نسيجياً أن أفضل طريقة للتعقيم السطحي للعقل المستخدمة كان بتعقيمها بـ الإيثانول بتركيز 70% ولمدة 30 ثانية ثم نقعها بـ محلول هيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 5% والحاوي على 80 Tween بتركيز 0.1 مل/لتر ومن ثم غسل العقل ثلاث مرات بالماء المقطر المعقم وبينت النتائج التي توصل إليها (Dai *et al.*, 2007) عند إكثاره للزعرور *Crataegus pinnatifida*، أن أفضل طريقة للتعقيم السطحي للعقل المفردة الحاوية على برعم هي غسلها بالماء الجاري ثم غمسها بالإيثانول تركيز 70% ولمدة 30 ثانية ثم نقعها بمحلول كلوريد الزئبق تركيز (0.1%,W/V) ولمدة 5 دقائق، ووجد (Margaret and Colin 1986) أن أفضل طريقة للتعقيم السطحي للعقل المحتوية على البراعم في الزعرور *Crataegus brachyantha, Sa.* باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم التجاري (10% Clorox bleach) تركيز 0.5 % ولمدة 15 دقيقة.

يوجد العديد من الدراسات حول أنواع السيتوكينينات وتراكيزها المناسبة لإكثار الأصناف النباتية نسيجياً. فقد أشار (Nandi *et al.*, 1989) إلى أن البنزيل أدينين (BA) و الكينتين (Kin) من السيتوكينينات التي يمكن وجودها طبيعياً وهي تنتمي إلى مشتقات الأدينين، وأشار (Elliott, 1972) إلى أن محتوى نموات التفاح المكاثر نسيجياً من BA منخفض بدليل موت بعض النموات المزروعة في وسط خال من BA . مما يدل على ضرورة إمداد وسط الإكثار بالـ BA وبالتركيز المناسب حسب النوع النباتي المدروس، ووجد (Kataoka and Inoue, 1993) لدى إكثاره لأحد أصول التفاح نسيجياً، اختلاف استجابة النموات في مرحلة الإكثار باختلاف نوع وتركيز السيتوكينين المضاف للوسط. كما وجد أيضاً أن إضافة BA إلى وسط الإكثار وبتركيز

(0,5– 1) ملغ/ ليتر قد حرض على زيادة عدد النموات، وقد كان له تأثير سلبي من حيث زيادة طول النموات بينما لاحظ أن Kin لم يكن له تأثير كبير على طول النموات عند إضافته لوسط الإكثار كما وجد أيضاً أن التراكيز العالية من Kin قد زادت عدد النموات قليلاً.

3- طرائق توصيف الزعرور:

بهدف توصيف الزعرور اتبعت طرائق تقليدية اعتمدت على التوصيف الشكلي ولتحديد القرابة الوراثية بشكل أكثر دقة اتبعت طرائق التوصيف باستخدام تقانة البيولوجيا الجزيئية.

أجريت في سورية العديد من الدراسات حول التوصيف الشكلي للزعرور اعتماداً على المواصفات الشكلية للثمار والأوراق والأزهار، فقد بينت النتائج وجود نوعين من الزعرور هما *C. azarolus* و *C. sinaica* في محافظة السويداء (مزهر، 1998)، وفي بعض مناطق ريف دمشق تبين وجود ثلاث مجموعات تصنيفية رئيسة تختلف عن بعضها البعض بمجموعة من المتغيرات الشكلية والبيئية ضمن الزعرور *C. azarolus var. aronia* كما تبين وجود نوعين من الزعرور هما *C. azarolus* و *C. monogyna* (ضميرية، 2001)، وفي الساحل السوري ، أظهرت النتائج وجود خمسة طرز مظهرية من المحتمل أن تكون منتمية إلى ثلاثة طرز وراثية تتبع جميعها النوع *Crataegus azarolus* (ديب، 2002). كما قامت (ريا، 2005) بتوصيف الزعرور في المنطقة الشمالية الغربية من سورية، و بينت النتائج التي توصلت إليها وجود بعض الأفراد المنتمية للنوع *Crataegus monogyna* تحوي ثمارها على بذرتين، و صنفت تحت نوع تابع للنوع المذكور، كما أظهرت النتائج أيضاً وجود بعض الأفراد التي تنتمي للنوع *Crataegus azarolus* جرى تصنيفها على أنها تحت نوع للنوع السابق.

و عالمياً قام (Balta *et al.,* 2006) بالتوصيف الشكلي لـ 42 طرازاً برياً تنتمي لخمسة أنواع من الزعرور بالاعتماد على مجموعة من الصفات الشكلية للثمار والبذور.

وفي دراسة لتحديد درجة القرابة الوراثية لمجموعة من الأنواع النباتية التابعة للعائلة الوردية ومنها نوعان من الزعرور، استخدمت الطرائق البيوكيميائية والكيميائية، اعتماداً على الرحلان الكهربائي للبروتين المستخلص من البذور *(*Dowidar *et al., 2003)*، واستطاع (Demiray, 2007) التمييز بين عدة أنواع من الزعرور بمقارنة محتوى الأوراق من بلورات أوكزالات الكالسيوم.

أما الطرائق الحديثة لتوصيف أنواع الزعرور فإنها تعتمد على التوصيف الجزيئي حيث استخدمت تقانتا RFLP و SSR لتحديد درجة الاختلاف على مستوى المادة الوراثية

الموجودة في الصانعات الخضراء لمجموعة من الأفراد المنتمية لنوع الزعرور *C. monogyna* و *C. laevigata*، حيث تم دراسة 21 فرد تنتمي للنوع الأول و 9 أفراد تنتمي للنوع الثاني، وقد بينت النتائج وجود مجموعة من الأفراد المتميزة داخل كل نوع كما أظهرت غياب تأثير التوزيع الجغرافي في إظهار الاختلافات بين الأفراد المنتمية للنوع الواحد (Fineschi *et al.,* 2004).

ولتحديد درجة القرابة الوراثية لمجموعة من الأنواع النباتية التابعة للعائلة الوردية ومنها خمسة أنواع من الزعرور، استخدمت التقنيات المعتمدة على التتالي النيكلوتيدي للـ DNA 2006 (Verbylaite *et al.,*) كما استخدمت أيضاً في التوصيف الجزيئي لثلاثة أنواع من الزعرور في محافظة السويداء، وقد توافقت النتائج التي تم التوصل إليها مع التوصيف المورفولوجي للأنواع المدروسة، والتي أثبتت أن النوع *C. sinaica* قد نتج عن التهجين بين النوعين *C. azarolus* و *C. monogyna* (Albarouki and Peterson., 2007).

وتشير الدراسة المرجعية إلى وجود العديد من الأبحاث حول استخدام تقنية التباينات الناتجة عن التضخيم العشوائي لقطع DNA (RAPD) في تحديد الأنواع النباتية التابعة لتحت الفصيلة التفاحية والتي ينتمي لها جنس الزعرور، فقد استخدمت هذه التقنية في تعريف بعض الأصناف والأصول التابعة للتفاح وتوثيقها، وتحديد درجة القرابة الوراثية بينها، بالإضافة إلى تحديد الموطن الأصلي للأصناف المزروعة:

(Harada *et al.,* 1993; Koller *et al.,* 1993; Mulcahy *et al.,* 1993; Landry *et al.,* 1994; Trancred, 1994; Dunemann *et al.,* 1994; Yae and ko, 1995; Autio *et al.,* 1998; Koga *et al.,* 1998; Goulao *et al.,* 2001; Forte *et al.,* 2002; Gonzalez *et al.,* 2003; Royo and Itoiz, 2004; Modgil *et al.,* 2005; Iannaccone *et al.,* 2007)

كما استخدمت تقنية RAPD أيضاً في دراسة وتوصيف بعض أصول وأصناف الكمثرى

(Oliveira *et al.,* 1999; Sharifani and Jackson, 2002; Schiliro *et al.,* 2001; Erig and Schuch, 2003; Muzher, 2004).

الفصل الثاني

مواد البحث وطرائقه

1- مكان وفترة تنفيذ البحث:

نفذ البحث في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية – قسم بحوث التقانات الحيوية– دائرة زراعة الأنسجة النباتية ودائرة البيولوجيا الجزيئية، بالتعاون مع قسم البساتين، كلية الزراعة جامعة تشرين، وذلك في الأعوام 2006 و 2007 و 2008 .

2- الإكثار الخضري الدقيق:

2-1- المادة النباتية:

جرت الدراسة على نوع الزعرور *Crataegus azarolus*, L. ، جمعت الأفرع بعمر سنة من شجرة معمرة في رنكوس بمنطقة التل (العينة رقم 20) قبل بدء سريان العصارة، وحضرت الأجزاء النباتية بأخذ العقل المحتوية على برعم جانبي قبل تفتحه (أخذت العقل من الأفرع مباشرة) بلغ عدد العقل 300 عقلة، كما أخذ البرعم نفسه بعد تفتحه (بعد غمر قواعد الأفرع في الماء عدة أيام بدرجة حرارة الغرفة حتى تتفتح البراعم) بلغ عدد البراعم 150 برعم.

2-2- مراحل الإكثار الخضري الدقيق:

2-2-1- التعقيم السطحي للأجزاء النباتية:

وضعت الأجزاء النباتية (العقل ذات البراعم غير المتفتحة والبراعم نفسها بعد تفتحها) كل على حدة، في أوعية زجاجية فيها ماء، أضيف ثلاث قطرات من الصابون السائل لكل 100 مل ماء، تم تغطيتها بقطعة من الشاش ثم وضعت تحت الماء الجاري لمدة ساعة، بعد ذلك عوملت بمبيد فطري (بيوميل) 0.5 غرام / 100 مل ولمدة 15 دقيقة، غسلت بالماء المقطر ثم نقعت بكحول إيثيلي تركيز 70% لمدة دقيقة واحدة، بعدها جرى تطبيق معاملات التعقيم السطحي تحت جهاز العزل الجرثومي وكانت المعاملات على الشكل التالي :

آ- تعقيم العقل ذات البراعم غير المتفتحة:

1- النقع في محلول ثنائي كلوريد الزئبق $HgCl_2$ تركيز 0.01 % لمدة 5 و10دقائق.

2- النقع في محلولين من الكلوركس التجاري، تركيز 15% لمدة 30 دقيقة، وتركيز 30 % لمدة 15 دقيقة (المادة الفعالة في الكلوركس التجاري هي هيبوكلوريت الصوديوم تركيز 5.25%).

3- النقع في محلول هيبو كلوريت الكالسيوم تركيز 10غرام /ليتر لمدة 5 و 15 دقيقة.

ب- تعقيم البراعم المتفتحة:

جرت الدراسة لتحديد الزمن الأفضل للتعقيم بالنقع في محلول الكلوركس التجاري المذكور سابقاً تركيز 15%، حيث نقعت البراعم المتفتحة لمدة : 5، 10، و 15 دقيقة.

أضيف لجميع معاملات التعقيم قطرة من محلول توين 20 لكل 100 مل من محلول التعقيم لخفض التوتر السطحي، وغسلت الأجزاء النباتية بعد الانتهاء من معاملات التعقيم بالماء المقطر المعقم ثلاث مرات.

بعد التعقيم السطحي للأجزاء النباتية (العقل و البراعم) باستخدام معاملات التعقيم المختلفة، زرعت في أنابيب تحوي 15 مل من وسط (½MS) الخالي من منظمات النمو وبمعدل 50 عقلة أو برعم لكل معاملة، بعد أسبوع من الزراعة، استبعدت الأنابيب الملوثة، وجرى حساب كفاءة معاملات التعقيم، وأخذت القراءات في هذه المرحلة من حيث عدد الأجزاء الملوثة، نسبة التلوث، عدد الأجزاء غير الملوثة، عدد الأجزاء الحية (النامية) من أصل الأجزاء غير الملوثة، ونسبتها.

بعد شهر من الزراعات الأولية، أعطت الأجزاء النباتية المزروعة نموات خضرية أعيدت زراعتها على أحد الأوساط المغذية (الوسط MS مضافاً له BA تركيز 5 ميكرومول/ ل و IBA تركيز 0.5 ميكرومول /ليتر) لمدة 3 أشهر وبفاصل 4 أسابيع بين عمليات النقل المختلفة و ذلك بهدف الحصول على عدد كاف من النموات الخضرية لإجراء تجارب الإكثار على أوساط الإكثار الإختبارية.

2-2-2- الإكثار الخضري الدقيق:

قسمت التفرعات الخضرية إلى أجزاء (نموات بطول 1-2 سم مع عدة براعم جانبية) وزرعت على أوساط الإكثار الإختبارية (جدول 2). وبعد 4 أسابيع من الزراعة، أخذت القراءات بتسجيل متوسط عدد التفرعات (النموات الخضرية) وطولها.

2-2-3- التجذير في الأنابيب:

نقلت النموات الخضرية بطول 2 - 3 سم إلى أنابيب اختبار تحوي 10 مل من أوساط التجذير المختبرة، وبعد شهر من الزراعة أخذت القراءات التالية:

1- النسبة المئوية للتجذير.

2- متوسط عدد الجذور.

3- طول الجذور.

2-2-4- التقسية:

نقلت النبيتات ذات الجذور إلى أصص تحوي خليطاً من البيرليت والبيتموس بنسبة1:2 (حجم/حجم) على الترتيب، وحضنت ضمن الظروف التالية:

فترة ضوئية 16 / 8 ساعة (إضاءة /ظلام)، ودرجة حرارة 18 ± 1 م ليلاً و24 ± 1 م نهاراً وشدة إضاءة 2000 لوكس. غطيت النبيتات بأكياس من البولي ايتيلين للمحافظة على الرطوبة العالية، وتم خفض الرطوبة تدريجياً بعمل ثقوب صغيرة ثم أكبر فأكبر حتى إزالة الأكياس نهائياً بعد 4 أسابيع، ثم نقلت النبتات إلى البيت الزجاجي.

2-3- الأوساط الغذائية:

2- 3- 1- الوسط الأساس:

استخدم محلول موراشيج وسكوك (1962) Murashige and Skoog للعناصر المعدنية الكبرى والصغرى، مع الإضافات التالية: سكروز 30 غرام/ليتر، آجار 7غرام/ليتر. وضبطت حموضة الأوساط المغذية على درجة pH = 5.7 قبل التعقيم في جهاز التعقيم الرطب (الأوتوكلاف) على درجة حرارة 121 م ولمدة 20 دقيقة. جدول (1).

جدول (1): تركيب وسط موراشيج و سكوغ MS (1962) الأساس المستخدم بالدراسة

mg/ L	mM (ميلي مولار)	المكونـــــــــــات
		العناصر المعدنية الكبرى
1649	20.61	NH_4NO_3 نترات الأمونيوم
1917	18.8	KNO_3 نترات البوتاسيوم
438	3.0	$CaCl_2.2H_2O$ كلوريد الكالسيوم
370	1.5	$MgSO_4.7H_2O$ كبريتات المغنزيوم
172.6	1.26	KH_2PO_4 فوسفات البوتاسيوم
		Iron Source مصدر الحديد
27.8	0.1	$FeSo_4.7H_2O$ كبريتات الحديد
37.2	0.1	$Na_2EDTA.2H_2O$
		العناصر المعدنية الصغرى
6.2	0.1	H_3BO_3 حمض البوريك
22.5	0.1	$MnSo_4.4H_2O$ كبريتات المنغنيز
8.6	29.91	$ZnSo_4.7H_2O$* كبريتات التوتياء
0.83	5.0	KI* يوديد البوتاسيوم
0.25	1	$Na_2MoO_4.2H_2O$* موليبدات الصوديوم
0.025	0.1	$CuSO_4.5H_2O$* كبريتات النحاس
0.025	0.11	$CoCl_2.6H_2O$* كلوريد الكوبالت
		Vitamins الفيتامينات
100	0.56	Myo-inositol ميوإينوزيتول
0.4	1.19	Thiamine-Hcl* الثيامين الحامضي
0.5	2.43	Pyridoxine-Hcl* البيريدوكسين الحامضي
0.5	40.62	Nicotinic acid* حمض النيكوتين
30000	87.6	Sucrose سكروز
7000		Agar آجار
		5.7-5.8 pH درجة الحموضة

2- 3 -2- الأوساط المستخدمة في الزراعة التأسيسية:

استـــخدم الوسط الأساس MS بنصف تركيز أمـــلاح العناصـــر المعدنيـــة الكبـــرى بـــدون منظمات نمو.

2- 3 - 3 - الأوساط المستخدمة في الإكثار:

استخدم وسط MS بكامل تركيز أملاح العناصر المعدنية الكبرى مع منظمات نمو متنوعـــة حسب ما هو مبين في الجدول (2) وأعطيت الأرقام من 1 وحتى 17.

جدول (2): التراكيز المختلفة من منظمات النمو المستخدمة في إكثار الزعرور مخبرياً (التركيز ميكرومول / ليتر)

رمز الوسط	BA	Kin	IBA	NAA
MS1	5	0	0.5	0
MS2	10	0	0.5	0
MS3	15	0	0.5	0
MS4	20	0	0.5	0
MS5	5	0	0	0.5
MS6	10	0	0	0.5
MS7	15	0	0	0.5
MS8	20	0	0	0.5
MS9	0	5	0.5	0
MS10	0	10	0.5	0
MS11	0	15	0.5	0
MS12	0	20	0.5	0
MS13	0	5	0	0.5
MS14	0	10	0	0.5
MS15	0	15	0	0.5
MS16	0	20	0	0.5
MS17 (الشاهد)	0	0	0	0

2-3 – 4 – الأوساط المستخدمة في التجذير:

احتوت أوساط التجذير الوسط الأساس MS مع إضافة حمض الأندول بيوتريك IBA بثلاثة تراكيز حسب ما هو مبين في الجدول (3) إضافة إلى الشاهد (وسط الأساس بدون هرمون) .

جدول (3).التراكيز المختلفة من IBA المستخدمة لتجذير الزعرور مخبرياً (التركيز ميكرومول/ليتر)

رمز الوسط	IBA
R1	14.70
R2	9.80
R3	4.90
R4 (الشاهد)	0

2- 4- شروط الزراعة (التحضين):

حضنت الزراعات في غرفة النمو ضمن الظروف التالية :

فترة ضوئية 16 / 8 ساعة (إضاءة /ظلام)، ودرجة حرارة 18 ± 1 م ليلاً و24 ± 1 م نهاراً وشدة إضاءة 2000 لوكس.

2- 5- التحليل الإحصائي:

صممت التجربة كتجربة عاملية في تصميم عشوائي بسيط، تم في مرحلة الإكثار استخدام نوعين من السيتوكينين (Kin , BA) x أربعة تراكيز للسيتوكينين (5,10,15,20 ميكرومول / ليتر) x نوعين من الأوكسين (IBA,NAA) x تركيز واحد للأوكسين (0.5 ميكرومول / ليتر) ، بلغ عدد المعاملات 2 x 4 x 2 x 1 = 16 معاملة بالإضافة لمعاملة الشاهد الخالية من منظمات النمو، وبالتالي بلغ عدد المعاملات الكلية في مرحلة الإكثار 17 معاملة، احتوت المعاملة الواحدة على 40 أنبوباً.

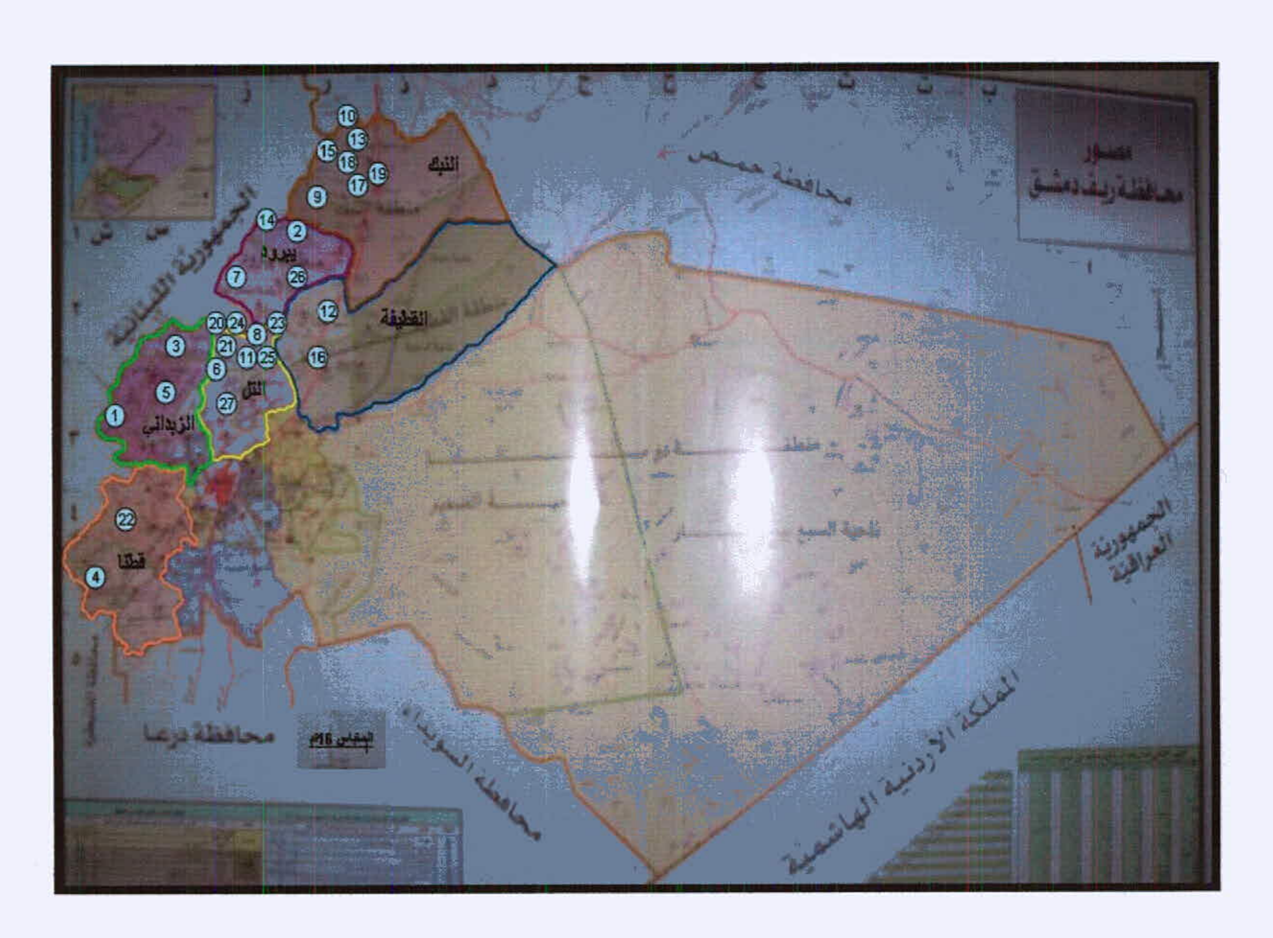
أما في مرحلة التجذير فقد استخدم نوع واحد من الأوكسين (IBA) x ثلاثة تراكيز (14.70- 9.80 - 4.90 ميكرومول/ ليتر)، بلغ عدد المعاملات 1 x 3 = 3 معاملات بالإضافة لمعاملة الشاهد الخالية من الأوكسين، وبالتالي بلغ عدد المعاملات الكلية في مرحلة التجذير 4 معاملات، احتوت المعاملة الواحدة على 20 أنبوباً.

حللت المعطيات والقراءات لكل من التكاثر والتجذير بواسطة الحاسوب باستخدام البرنامج الإحصائي MSTAT وباختبار ANOVA-2، وقورن بين المتوسطات بحساب أقل فرق معنوي LSD على مستوى 0.05 .

3- التوصيف الجزيئي للزعرور

3-1- المادة النباتية:

جرت الدراسة على مجموعة من الطرز البرية التي تتبع نوع الزعرور *Crataegus azarolus*. L، وجمعت العينات النباتية وعددها 27 عينة من مجموعة من المواقع التابعة لست مناطق في ريف دمشق، والتي حددت بالاعتماد على الدراسات المحلية التي أشارت إلى تواجد الزعرور فيها. أخذت نموات ورقية حديثة من كل نبات على حده، وتم تنظيفها وغسلها بالماء المقطر، وحفظت في الآزوت السائل، ثم خزنت على درجة حرارة (-80 م) الى حين الاستخدام، و يبين الجدول (4) والشكل (1) المواقع التي جمعت منها المادة النباتية.



شكل (1)، خريطة تمثل المواقع التي جمعت منها الطرز البرية للزعرور *Crataegus azarolus*. L

جدول (4) : المواقع التي جمعت منها المادة النباتية لدراسة التوصيف الجزئي للزعرور المنتشر في ريف دمشق

اسم المنطقة		بعض المواصفات البيئية للمنطقة	اسم الموقع	رقم العينة في الموقع
التقسيم الجغرافي	التقسيم الإداري			
القلمون	التل (Altal)	الارتفاع بين 900-1700 متر، معدل الأمطار 200-350 ملم / سنة، التربة طينية لومية، غنية بالكلس	رنكوس	8-11-20-23-24-25-21
			تلفيتا	6
			منين	27
جبل الشيخ	قطنا (Kattana)	تعتبر منطقة استقرار أولى، معدل الأمطار يصل إلى 800 ملم/سنة، الارتفاع يتراوح بين1000-1500 متر،الأراضي غنية بالحديد	مزرعة بيت جن	4
			حرفا	22
القلمون	القطيفة (Quttaifa)	الارتفاع 1300-1600 متر، معدل الأمطار 200-250 ملم/ سنة، التربة لومية طينية	عين التينة	16
			معلولا	12
القلمون	النبك (Nabek)	الارتفاع بين 1500-1800 متر، معدل الأمطار بين 200-250 ملم/سنة، الأراضي فقيرة بالمادة العضوية- تحوي صخور قاسية	المشرفة	9
			قارة	10-15-13-18-17-19
القلمون	يبرود (Yabroud)	الارتفاع 1200-1700 متر، معدل الأمطار 220-250 ملم/ سنة، التربة طينية لومية، كلسية، تحوي صخور قاسية	رأس المعرة	2-14
			الصرخة	26
			عسال الورد	7
جبال لبنان الشرقية	الزبداني (Zabadani)	الارتفاع 1200-1700 متر، معدل الأمطار 500-550 ملم/سنة، التربة طينية إلى طينية لومية	سرغايا	3
			جديدة يابوس	1
			الزبداني	5

ملاحظة: تم إضافة صور توضيحية للعينات النباتية المستخدمة في هذه الدراسة في الملاحق

2-3- مراحل التوصيف الجزيئي باستخدام تقنية (RAPD)

تعتبر تقنية التباينات الناتجة عـــن التضخيم العـشوائي لقطع الـ DNA RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) من أولى التقانات الجزيئية التي تعتمد على التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR (Polymerase Chain Reaction) وقد طورت هذه التقنية بشكل مستقل من قبل كل من: (Welsh and Mcclelland 1990; Williams *et al.*, 1990)، حيث يمكن استخدامها بهدف التوصيف الجزيئي للأصناف النباتية، و تتميز بأنها سهلة الاستخدام ويمكن تطبيقها بسرعة، كما أنها تعطي تباينات كثيرة (This *et al.* 1997; Pasquale *et al.*, 2006)، وتمر هذه التقنية بمجموعة من المراحل وهي :

3-2-1 - استخلاص الـ DNA الكلي من الأوراق:

استخلص الـ DNA من العينات حسب طريقة (Chaudhry *et al.*, 1999)، بعد إجراء بعض التعديلات عليها تضمنت: إضافة الليثيوم كلوريد (Li Cl) تركيز 8 مولار إلى محلول الاستخلاص، وزيادة تركيز (CTAB) إلى 2 % للتخلص من السكريات المتعددة.

وفيما يلي الخطوات المتبعة:

1) طحن 4-5 أوراق من كل عينة نباتية في جفنه مبردة مع إضافة كمية كافية من الآزوت السائل للحصول على مسحوق ناعم من المادة النباتية .
2) يؤخذ (0.1 غرام) من العينة المطحونة، وتوضع العينات في أنابيب Ependorf سعة 2 مل وترقم الأنابيب حسب أرقام العينات النباتية.
3) يضاف لكل أنبوب 750 ميكروليتر من محلول الاستخلاص المبرد والمكون من:

0.35 m Glucose, 0.1 m Tris-Cl(pH 8), 0.005 m Na-EDTA (pH 8), 2 % (W/V) PVP-10, 0.1 % Ascorbic acid, 0.2 % 2-Mercaptoethanol

4) توضع الأنابيب على هزاز دوراني ولمدة (10 دقائق) حتى يتم التجانس.
5) توضع الأنابيب في الثلج لمدة 15 دقيقة .
6) توضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة (10 دقائق) وبسرعة (13000 دورة / دقيقة) وبدرجة حرارة (4 م) حتى يتشكل طوران (سائل- صلب).
7) التخلص من الطور السائل والاحتفاظ بالطور الصلب (الراسب) .
8) يضاف لكل أنبوب : 250 ميكروليتر من كلوريد الليثيوم (8 M) + 250 ميكرولتر من محلول الهضم lysis buffer والمكون من:

0.14m Sorbitol, 0.22 m Tris-Cl(pH 8), 0.8 m NaCl, 0.22 m Na-EDTA (pH 8), 2% (W/V) CTAB, 1% (W/V) PVP-10, 0.1 % Ascorbic acid, 0.2 % 2-Mercaptoethanol

مزج محلول الهضم مع الراسب بوضع الأنابيب في جهاز (Vortex) حتى التجانس .

9) تحضين الأنابيب لمدة (45 دقيقة) في حمام مائي بدرجة حرارة (65 مº) مع إجراء عملية تحريك وقلب للأنابيب بهدوء كل (10 دقائق) حتى يتجانس الراسب مع المحلول داخل الأنبوب.

10) تبريد الأنابيب بعد رفعها من الحمام المائي بوضعها في الثلج لمدة 5 دقائق.

11) يضاف لكل أنبوب (700 ميكروليتر من محلول (كلوروفورم / ايزوميل الكحول 24: 1) ويتم تحريك الأنبوب مع التقليب بهدوء ولمدة (15 دقيقة) بجهاز هزاز دوراني حتى التجانس وتشكل مستحلب .

12) توضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة (10 دقائق) وبسرعة (13000 دورة/ دقيقة) وبدرجة حرارة (25 مº) حتى تشكل ثلاثة أطوار داخل الأنبوب.

13) يؤخذ الوسط العلوي الرائق للأنبوب بحذر وتوضع في أنبوب جديد مع الانتباه لإعادة ترقيم الأنابيب من جديد، وتحفظ الأنابيب في هذه المرحلة والمراحل اللاحقة في الثلج.

14) تعاد الخطوات الثلاث السابقة حتى يتجمع حوالي (400 ميكروليتر) من الرشاحة.

15) يضاف للرشاحة 500 ميكروليتر من محلول (كلورفورم/ ايزوميل الكحول 24:1) وتوضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة (5 دقيقة) وبسرعة (13000 دورة/ دقيقة) وتنقل الطبقة العلوية الصافية إلى أنابيب جديدة مع الانتباه لإعادة الترقيم.

16) يضاف (50 ميكروليتر) من Na Cl (5M) ويتم تحريك الأنبوب بلطف مع المزج.

17) يضاف للرشاحة داخل الأنبوب ضعف حجمها من الإيتانول المطلق (100 %) ويهز الأنبوب مع التقليب بهدوء، و يلاحظ في هذه المرحلة تشكل خيوط بيضاء من الـــ DNA (Pellet).

18) توضع الأنابيب في المجمدة وبدرجة حرارة (– 20 مº) ولمدة (15 دقيقة).

19) توضع الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة 13000 دورة / دقيقة وبدرجة حرارة (4 مº) حتى يترسب الـــ DNA في أسفل الأنبوب.

20) تصب السائل ثم يغسل الراسب مرتين باستخدام الإيتانول (75 %) مع التحريك بهدوء ثم يسكب محلول الغسيل بهدوء.

21) يجفف الراسب بدرجة حرارة الغرفة لمدة (30 دقيقة) مع ترك الأنابيب مفتوحة أثناء عملية التجفيف.

22) بعد انتهاء عملية التجفيف، تتم الإذابة بإضافة حوالي (150 ميكروليتر) من الماء المقطر المعقم لكل أنبوب.

23) تخزن الأنابيب في البراد العادي لمدة يومين حتى تمام عملية ذوبان الـــ DNA .

24) تخزن الأنابيب في المجمدة بدرجة حرارة (–20 مº) إلى حين الاستخدام .

- اختبار نوعية الـ DNA المستخلص وتقدير تركيزه :

يجرى فحص نوعية الـ DNA بواسطة الـرحلان الكهربـائي باسـتخدام هـلام أغـاروز (gel agarose) 1 % مضافاً له محلول 1xTBE buffer و Ethidium bromide، ومن ثم إظهـار حـزم الـ DNA باستخدام الأشعة فوق البنفسجية (UV) ويستخدم مؤشر قياسي للإشارة لمواقـع وحجـم الحزم، تم انتقاء الأفضل من العينات وأعيـد عـزل DNA مـن العينـات ذات النوعيـة غيـر الجيدة، ويقاس تركيز الحمض النووي DNA في العينـات باسـتخدام مقيـاس الطيـف الـضوئي (spectrophotometer)، كما تم التأكد أيضاً من نقاوة الـ DNA بحـساب النـسبة 280/260 حيـث تراوحت بين (1.7– 2) للعينات المدروسة مما يدل على النقاوة الجيدة للـ DNA.

- تمديد عينات الـ DNA:

تم تمديد عينات الـ DNA بالماء المقطر المعقم، للوصول لتركيز (20ng/µl)، وهو التركيز المطلوب لتفاعل الـ PCR .

3-2- 2- تضاعف الحمض النووي DNA:

استخدم جهاز التفاعل السلسلي للبوليميراز PCR طراز Mastercycler-Eppendorf بحجم تفاعل 20 ميكرولتر و35 دورة، حيث تتكون كل دورة من ثلاث مراحل تؤدي الـى تـصنيع سلاسـل جديدة من الـ DNA. يبين الجدول (5) مكونات تفاعل PCR بينما يبين الجدول (6) مراحل عمـل PCR، أما الجدول (7) فيبين المرئسات التي استخدمت في هذا البحث.

جدول (5). مكونات تفاعل الـــ PCR

المادة	الحجم اللازم لعينة واحدة (ميكرو ليتر)
H20	5.3
5X PCR buffer	4
25 mM MgCl2	1.5
2 mM dNTPs	2
10 p.m/µl primer	2
5 U/µl Taq	0.2
20 ng/µl DNA	5
Total	20 µl

جدول (6). برنامج عمل الـــ PCR

عدد الدورات	الزمن	الحرارة/ درجة مئوية
1	2 دقيقة	94
34	45 ثانية	92
	1 دقيقة	36
	2 دقيقة	72
1	5 دقيقة	72
حفظ	لا نهاية	4

استخدم في البحث 64 مرئساً مصنعة لدى شركةVBC-GENOMICS, GERMANY حسب مرئسات مجموعة RAPD لشركة .OPERON Technologies, Inc، ويبين الجدول (7) التسلسل النكليوتيدي للمرئسات المستخدمة في الدراسة الحالية.

جدول (7). التسلسل النكليوتيدي للمرئسات (10-mer Primers) المستخدمة في تقنية الـــ RAPD في التوصيف الجزيئي للطرز البرية لنوع الزعرور .*Crataegus azarolus* L

اسم المرئس	التسلسل النيكلوتيدي	اسم المرئس	التسلسل النيكلوتيدي
OPA-01	CAG GCC CTT C	OPE-16	GGT GAC TGT G
OPA-02	TGC CGA GCT G	OPE-18	GGA CTG CAG A
OPA-04	AAT CGG GCT G	OPE-13	CCC GAT TCG G
OPA-05	AGG GGT CTT G	OPB-01	GTT TCG CTC C
OPA-06	GGT CCC TGA C	OPB-03	CAT CCC CCT G
OPA-07	GAA ACG GGT G	OPB-05	TGC GCC CTT C
OPA-08	GTG ACG TAG G	OPB-06	TGC TCT GCC C
OPA-09	GGG TAA CGC C	OPB-07	GGT GAC GCA G
OPA-10	GTG ATC GCA G	OPB-14	TCC GCT CTG G
OPA-11	CAA TCG CCG T	OPB-15	GGA GGG TGT T
OPA-12	TCG GCG ATA G	OPB-16	TTT GCC CGG A
OPA-13	CAG CAC CCA C	OPC-03	GGG GGT CTT T
OPA-15	TTC CGA ACC C	OPC-04	CCG CAT CTA C
OPA-16	AGC CAG CGA A	OPC-12	TGT CAT CCC C
OPA-17	GAC CGC TTG T	OPC-13	AAG CCT CGT C
OPA-18	AGG TGA CCG T	OPC-14	TGC GTG CTT G
OPA-19	CAA ACG TCG G	OPC-15	GAC GGA TCA G
OPA-20	GTT GCG ATC C	OPC-16	TTC CCC CCA G
OPE-01	CCC AAG GTC C	OPC-11	AAA GCT GCG G
OPE-02	GGT GCG GGA A	OPD-15	CAT CCG TGC T
OPE-03	CCA GAT GCA C	OPD-18	GAG AGC CAA C
OPE-04	GTG ACA TGC C	OPD-19	CTG GGG ACT T
OPE-10	CAC CAG GTG A	OPF-03	CCT GAT CAC C
OPE-11	GAG TCT CAG G	OPF-02	GAG GAT CCC T
OPE-12	TTA TCG CCC C	OPJ-10	AAG CCC GAG G
OPE-17	CTA CTG CCG T	OPD-20	ACC CGG TCA C
OPE-19	ACG GCG TAT G	OPL-01	GGC ATG ACC T
OPJ-11	ACT CCT GCG A	OPL-02	TGG GCG TCA A
OPJ-18	TGG TCG CAG A	OPL-03	CCA GCA GCT T
OPJ-19	GGA CAC CAC T	OPL-18	ACC ACC CAC C
OPJ-20	AAG CGG CCT C	OPL-19	GAG TGG TGA C
OPF-01	ACG GAT CCT G	OPL-20	TGG TGG ACC A

3-2- 3- تظهير نواتج تفاعل الـ PCR:

تفصل نواتج التفاعل بواسطة جهاز الرحلان الكهربائي، باستخدام هلامة من الأغاروز 2 %، تحتوي على الإيثيديوم برومايد 0,5 مايكروغرام/مل، ومحلول lxTBE buffer، وتطبيق جهد كهربائي مقداره 80 فولت لمدة ساعتين ونصف، تم تظهير حزم الـ DNA بتعريض الجل للأشعة فوق البنفسجية وتصويره باستخدام .Gel doc.

3-2- 4- التحليل الإحصائي للنتائج:

كررت جميع التفاعلات مرتين على الأقل، ودخلت في التحاليل الحزم الواضحة فقط والتي تتصف بالتكرارية، وحللت النتائج، وتمت مقارنة الحزم الناتجة، حيث أعطيت الحزمة بحال وجودها رقم 1 والحزمة الغائبة رقم 0، وعولجت البيانات إحصائياً باستخدام برنامج DARwin 5.0 حسب (Perrier and Jacquemoud-Collet, 2006) ، وتمت دراسة درجة التشابه الوراثي بين الطرز المدروسة من خلال معامل جاكارد Jaccard coefficient (Jaccard, 1908) بالاعتماد على المعادلة التالية:

$$GS(ij) = a / (a + b + c)$$

GS : درجة التشابه الوراثي بين i و j

a: عدد الحزم المشتركة بين i و j

b: عدد الحزم الموجودة في i والغائبة في j

c: عدد الحزم الغائبة في i والموجودة في j

استخدم التحليل العنقودي الذي يعتمد على نسبة التشابه الوراثي، من خلال طريقة: (UPGMA Method) وذلك لرسم شجرة القرابة الوراثية على شكل عنقودي Dendogram والتي تعكس درجة التشابه الوراثي بين الطرز النباتية المدروسة.

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

1. الإكثار الخضري الدقيق:

1-1- التعقيم السطحي وتأسيس الزراعات المعقمة:

1-1-1- نتائج تعقيم العقل :

بمقارنة نتائج استخدام مركبات التعقيم المختلفة، تبين أن كفاءة التعقيم بمحلول هيبوكلوريت الكالسيوم كانت منخفضة جداً، وتراوحت نسبة التلوث في الأجزاء المزروعة ما بين 88- 96 %، أما استخدام محلول كلوريد الزئبق فقد أعطى فعالية أكبر بالتعقيم مقارنة مع هيبوكلوريت الكالسيوم، إذ تراوحت نسبة التلوث في الأجزاء المزروعة مابين 30- 40 %، إلا أن نسبة الموت فيها كانت كبيرة جداً، وخاصة عند زمن التعقيم 10 دقائق. بينما أعطت معاملة التعقيم بمحلول الكلوركس التجاري الذي يحتوي على هيبو كلوريت الصوديوم بنسبة 5.25 % وبتركيز 30 % ولمدة 15 دقيقة، نتائج مقبولة حيث بلغ معدل التلوث 50% (جدول رقم 8). الشكل رقم (2). وهذا يتطابق مع النتائج التي توصل إليها (Okamura et al., 1999) وتتوافق جزئياً مع دراسة (Rajesh and Bist, 2002) باستخدام كلوريد الزئبق بتركيز 0.1 % ولمدة 4 دقائق وهيبوكلوريت الصوديوم بتركيز 10% لمدة 4 دقائق. وكذلك تتفق النتائج مع ما حصل عليه (Margaret and Colin 1986) وتتوافق نتائج الدراسة الحالية جزئياً مع النتائج التي توصل إليها (Dai *et al.*, 2007) عند إكثاره للزعرور *Crataegus pinnatifida*، كما بينت النتائج التي توصلنا إليها في الدراسة الحالية، أن هيبوكلوريت الكالسيوم كان منخفض الفعالية مقارنة مع هيبوكلوريت الصوديوم، وقد يعود ذلك لبطء نفوذه إلى الأنسجة النباتية (Jona and Menini, 1987)، وإمكانية تخزينه لفترة محدودة من الزمن (Pierik, 1987). وبالرغم من فعالية كلوريد الزئبق في التعقيم السطحي، إلا أن المادة النباتية النظيفة التي تم الحصول عليها كانت ميتة، وهذا يعود للتأثير السمي لكلوريد الزئبق. وقد أشارت نتائج بعض الدراسات إلى ذلك ونصحت بعدم استخدامه (Lizarraga *et al.*, 1991).

1-1-2- نتائج تعقيم البراعم :

أعطت معاملة التعقيم بمحلول الكلوركس التجاري الذي يحتوي على هيبو كلوريت الصوديوم بنسبة 5.25 % وبتركيز 15 % ولمدة 15 دقيقة، أفضل معاملة تعقيم، حيث أعطت هذه المعاملة أقل نسبة من التلوث وهي 36% مقارنة مع المعاملات الأخرى، وقد لوحظ بدء نمو البراعم السليمة خلال أسبوع من الزراعة، وقد استخدمت هذه النموات فيما بعد في الزراعة التأسيسية (جدول رقم 9) و شكل رقم (3). ويمكن أن يعزى انخفاض نسب التلوث

في حال زراعة البراعم مقارنة مع العقل إلى صغر حجم المادة النباتية (البـــراعم المتفتحـــة) مقارنة مع العقل وبالتالي صغر مساحة الجزء النباتي المعرض للتلوث، بالإضافة إلى حداثـــة تفتح البراعم وبالتالي انخفاض زمن تعرضها للملوثات الخارجية.

1-1-3- إفراز المركبات الفينولية :

تلعب المركبات الفينولية التي يفرزها النبات خلال المرحلة التأسيسية دوراً مثبطاً للنمو حيث تؤدي إلى اسمرار الأنسجة وتحللها وموتها. وفي هذه الدراسة، لم يلاحظ وجود إفرازات فينولية، رغم أن الزعرور يتبع العائلة الوردية وتحت العائلة التفاحية والمعروفة بارتفاع مستوى المواد الفينولـــية فيها (Bahorun *et al*., 1994; Rakotoarison *et al*., 1997) وربما يعزى هذا إلى الوقت الذي جمعت وزرعت فيه المادة النباتية خلال العام، وهو بداية الربيع قبل سريان العصارة وبدء النمو حيث تكون المواد الفينولية في حدودها الدنيا، وهذا يتفق مع النتائج التي توصل إليها Hutchinson (1984) لدى إكثاره لأحد أصناف التفاح نسيجياً، الذي وجد أن حدوث ظاهرة الاسمرار كان بمستوى أقل في مرحلة الزراعة التأسيسية عند جمع المادة النباتية في بداية الربيع وخلال فصل الصيف مقارنة بأوقات أخرى من العام، كما يمكن أن يعزى ذلك أيضاً إلى احتواء الزعرور على مضادات الأكسدة، وذلك استناداً إلى النتائج التي بينها (Rakotoarison *et al*. 1997).

جدول (8). كفاءة معاملات التعقيم المستخدمة في التعقيم السطحي للعقل المحتوية على براعم جانبية غير متفتحة

المعاملة	عدد العقل المزروعة	عدد العقل الملوثة	نسبة التلوث %	عدد العقل غير الملوثة (الحية+الميتة)	عدد العقل الحية	نسبة العقل الحية من مجموع العقل المعاملة %
كلوريد الزئبق تركيز 0.01% لمدة 5 دقائق	50	20	%40	30	10	20
كلوريد الزئبق تركيز 0.01% لمدة 10 دقائق	50	15	%30	35	5	10
هيبوكلوريت الكالسيوم تركيز 10غ/ليتر لمدة 5 دقائق.	50	48	%96	2	2	0.4
هيبوكلوريت الكالسيوم تركيز 10غ/لتر لمدة 15 دقيقة.	50	44	%88	4	4	0.8
كلوراكس تجاري تركيز 15% لمدة 30 دقيقة	50	38	%76	12	12	24
كلوراكس تجاري تركيز 30% لمدة 15 دقيقة	50	25	%50	25	25	50

جدول (9) : كفاءة زمن التعقيم بمحلول الكلوركس التجاري في التعقيم السطحي للبراعم الجانبية المتفتحة

تركيز محلول الكلوركس التجاري	الزمن (دقيقة)	عدد البراعم المزروعة	عدد البراعم الملوثة	نسبة التلوث %	عدد البراعم غير الملوثة (الحية+الميتة)	عدد البراعم الحية	نسبة البراعم الحية من مجموع البراعم المعاملة %
%15	5	50	35	70	15	15	30
%15	10	50	30	60	20	19	40
%15	15	50	18	36	32	30	60



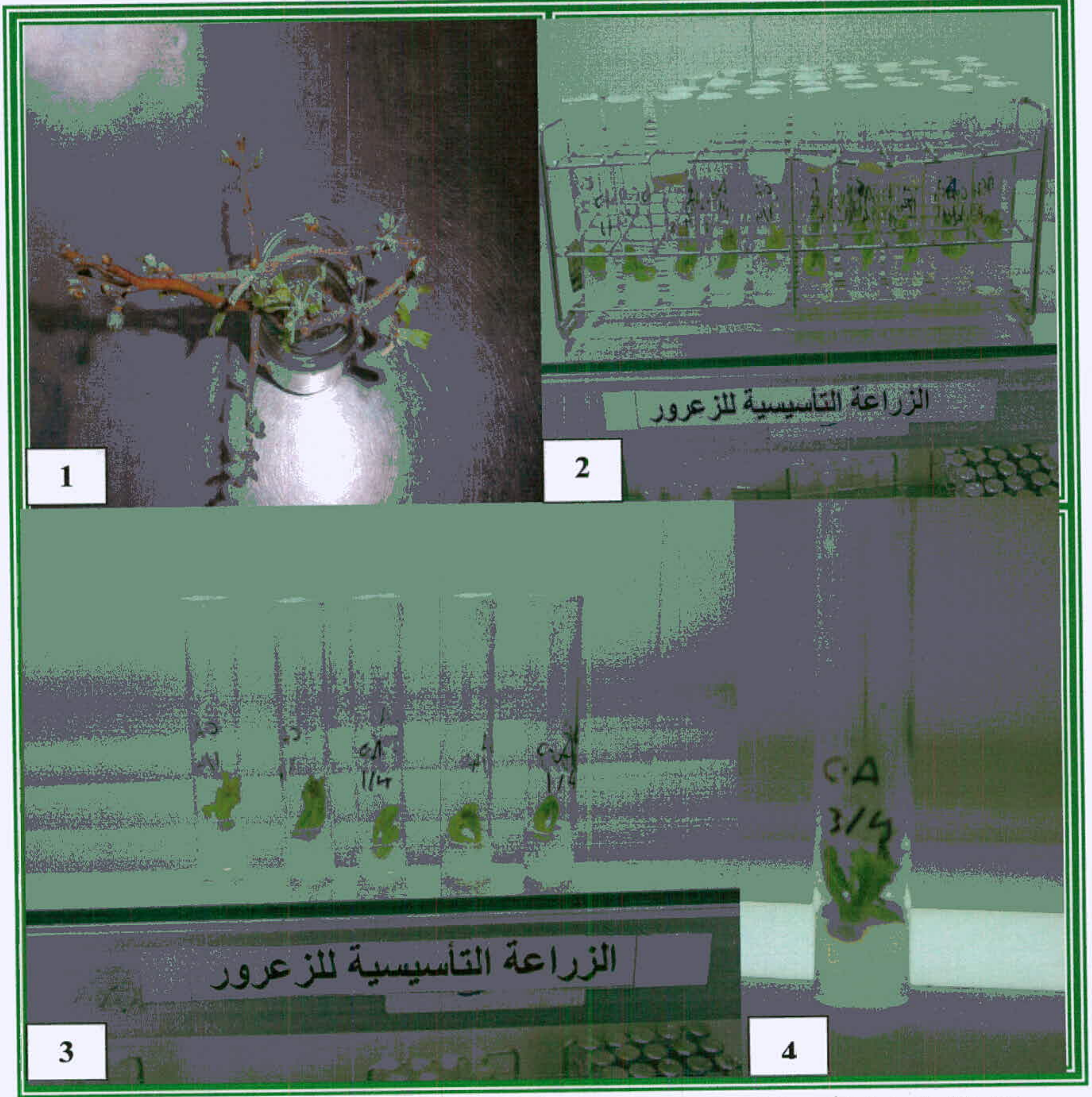
شكل (Z). الزراعة التأسيسية في الزجاج لعقل الزعرور المحتوية على براعم جانبية غير متفتحة

1 : الأفرع المجموعة من الزعرور والحاوية على براعم جانبية غير متفتحة والجاهزة لأخذ العقل

2 : العقل المزروعة في الوسط الأساس بعد التعقيم السطحي، يلاحظ تفتح البراعم بعد أسبوع من الزراعة

3 : ظهور النموات الخضرية من البراعم المتفتحة

4 : المراحل المختلفة لنمو وتطور البراعم



شكل (3). الزراعة التأسيسية في الزجاج للبراعم الجانبية المتفتحة للزعرور

1 : تفتح البراعم بعد غمر قواعد الأفرع في الماء لعدة أيام

2 و 3 : زراعة البراعم المتفتحة في وسط الأساس

4 : ظهور النموات الخضرية من البراعم المزروعة

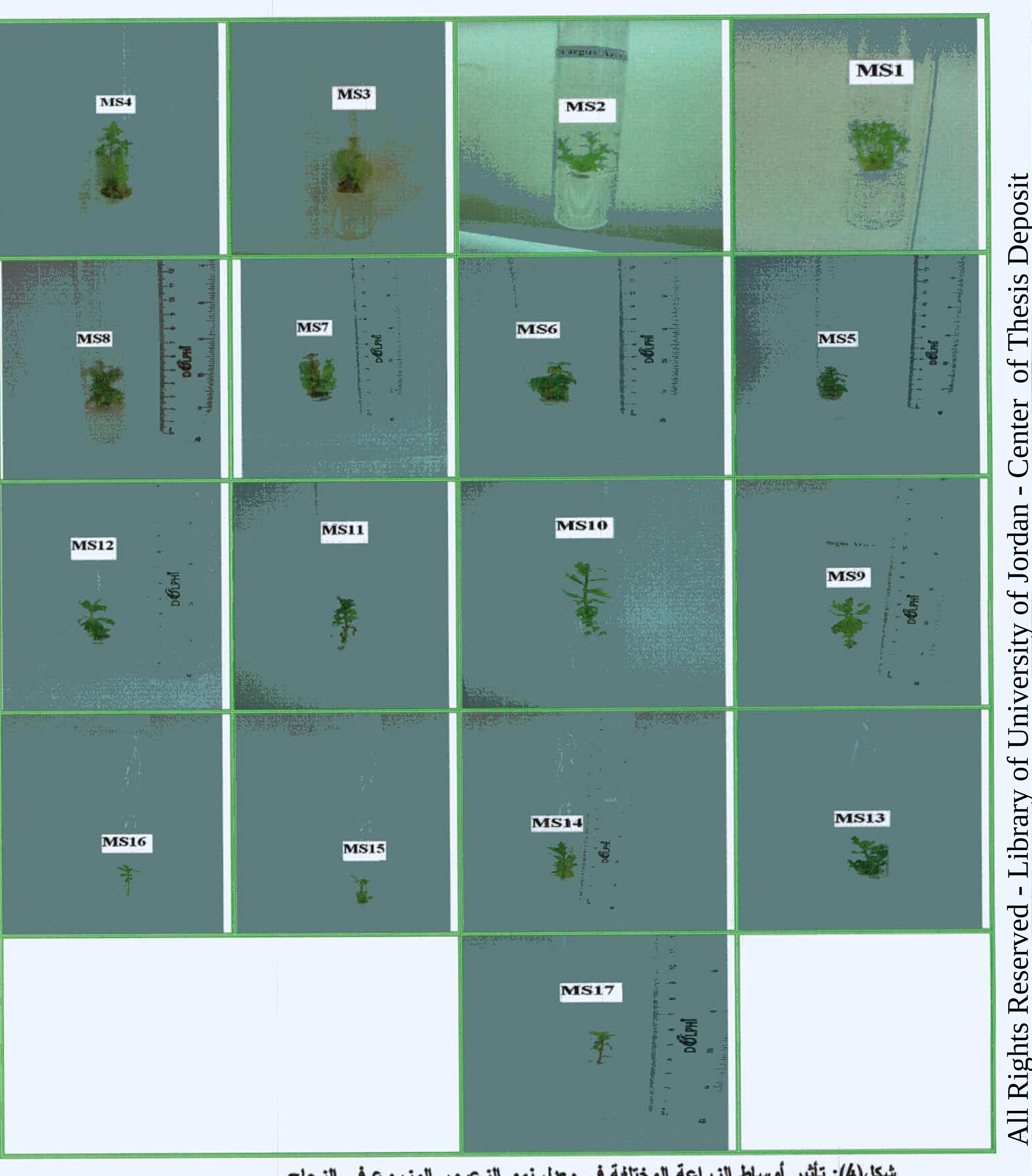
1-2- تأثير أوساط الزراعة في طول وعدد النموات المتشكلة :

يبدو من النتائج الواردة في الجدول رقم 10 والأشكال 4 و 5 و 6 بشكل عام، تفوق الوسط MS1 المحتوي على التوافق الهرموني (5µM BA + 0.5µM IBA) على جميع الأوساط الأخرى وبفروق معنوية، حيث بلغ متوسط طول النموات على هذا الوسط 2.7 سم، ومتوسط عدد النموات 4 نموات جديدة كل أربعة أسابيع، بدءاً من نمو واحد، وبالتالي يمكن القول إن هذا الوسط قد حقق أعلى معدل نمو مع أفضل استطالة للنموات الخضرية أيضاً، ازداد معدل الإكثار مع تكرار إعادة الزراعة على الوسط المذكور حيث وصل متوسط عدد النموات الجديدة المتشكلة إلى 6 نموات خضرية وذلك خلال الزراعة الثانوية الخامسة، وهذا يتطابق مع نتائج (Rajesh and Bist, 2002; Hong *et al.*, 1987; Margaret and Colin 1986)

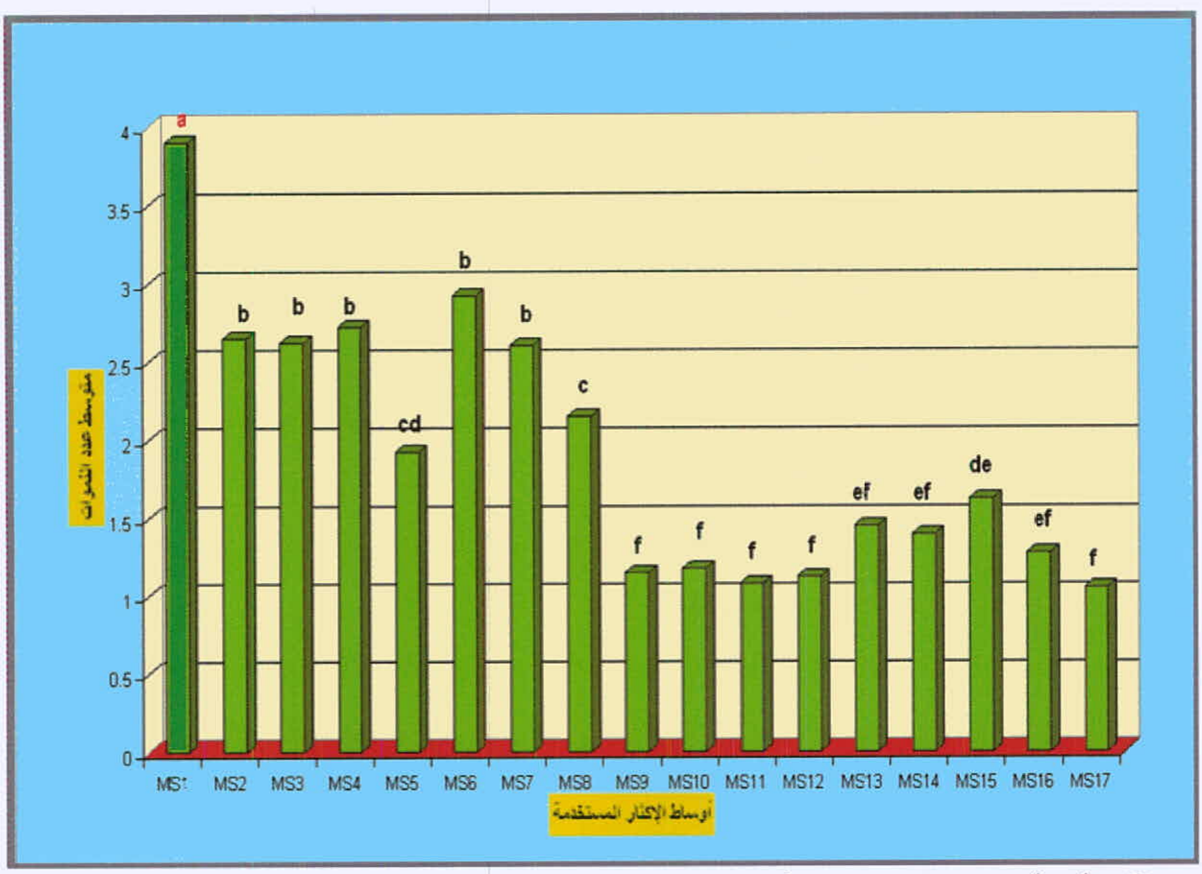
جدول (10). تأثير تراكيز مختلفة من منظمات النمو في متوسط عدد وطول نموات الزعرور *Crataegus azarolus*, L. الجديدة المتشكلة بالزراعة المخبرية كل أربعة أسابيع

رمز الوسط	تركيب الوسط المغذي تركيز الهرمون ميكرومول / ليتر	متوسط طول النموات /سم	متوسط عدد النموات
MS1	**MS + 5 BA+ 0.5 IBA**	**2.690a±0.106**	**3.900a±0.341**
MS2	MS + 10 BA + 0.5 IBA	2.266**b**±0.131	2.650**b**±0.228
MS3	MS + 15 BA + 0.5 IBA	1.813**defg**±0.101	2.625**b** ±0.174
MS4	MS + 20 BA + 0.5 IBA	1.612**ghij**±0.121	2.725**b**±0.215
MS5	MS + 5 BA+ 0.5 NAA	1.413**j**±0.062	1.925**cd**±0.121
MS6	MS + 10 BA + 0.5 NAA	1.563**hij**±0.067	2.925**b**±0.147
MS7	MS + 15 BA + 0.5 NAA	1.550**hij**±0.082	2.600**b**±0.192
MS8	MS + 20 BA + 0.5 NAA	1.538**ij**±0.114	2.150**c**±0.137
MS9	MS + 5 Kin + 0.5 IBA	1.900**de**±0.090	1.150**f**±0.057
MS10	MS + 10 Kin + 0.5 IBA	2.175**bc**±0.099	1.175**f**±0.071
MS11	MS + 15 Kin + 0.5 IBA	1.837**defg**±0.075	1.075**f**±0.042
MS12	MS + 20 Kin + 0.5 IBA	2.000**cd**±0.098	1.125**f**±0.053
MS13	MS + 5 Kin + 0.5 NAA	1.650**fghij**±0.074	1.450**ef**±0.124
MS14	MS + 10 Kin + 0.5 NAA	1.788**defgh**±0.078	1.400**ef**±0.112
MS15	MS + 15 Kin + 0.5 NAA	1.675**efghi**±0.087	1.625**de** ± 0.137
MS16	MS + 20 Kin + 0.5 NAA	1.862**def**±0.084	1.275**ef**±0.80
MS17	MS	1.737**efghi**±0.044	1.050**f**±0.035
LSD 0.05		**0.2425**	**0.4145**

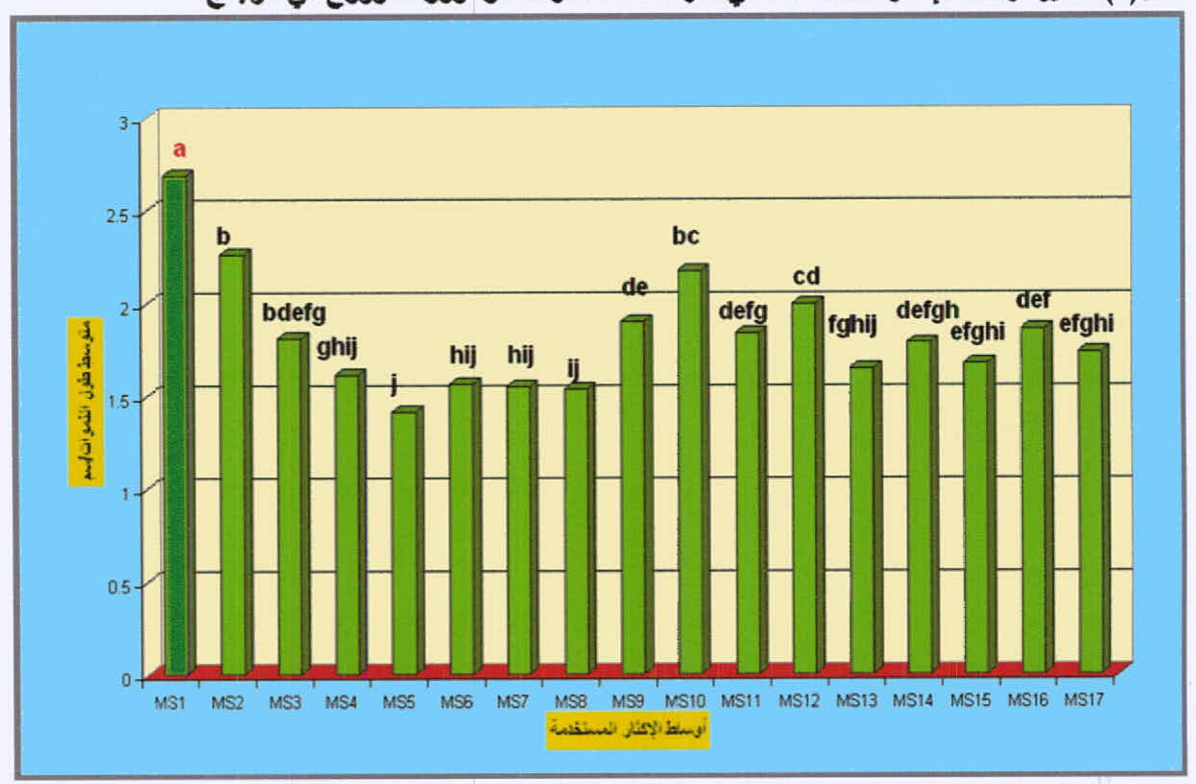
ملاحظة: القراءات هي متوسط 40 أنبوباً ± الخطأ المعياري SE



شكل(4): تأثير أوساط الزراعة المختلفة في معدل نمو الزعرور المزروع في الزجاج



شكل(5): تأثير أوساط الإكثار المستخدمة في متوسط عدد نموات الزعرور المزروع في الزجاج



شكل(6). تأثير أوساط الإكثار المستخدمة في متوسط طول نموات الزعرور المزروع في الزجاج

ملاحظة : الأعمدة ذات الأحرف المشتركة غير مختلفة إحصائياً (أو معنوياً)

3-1- تأثير نوع وتركيز السيتوكينين في طول النموات وعددها:

تفوقت الأوساط التي تحتوي على BA بجميع التراكيز على الأوساط التي تحتوي على Kin بالتراكيز ذاتها، وبفروق معنوية وذلك من حيث عدد النموات الجديدة المتشكلة، وأدت زيادة تركيز BA في الوسط من 5 إلى 10 ميكرومول/ ليتر إلى تناقص عدد النموات وبفروق معنوية، بينما لم تؤثر زيادة تركيز Kin في الوسط في عدد النموات، وإنما أدت إلى زيادة في متوسط طولها (شكل 7 و 8). و تميزت النموات المتشكلة في الأوساط المضاف لها Kin بمسطح ورقي كبير نسبياً مقارنة مع الأوساط المضاف لها BA ، وهذا يتوافق مع النتائج التي توصل إليها (Marrin *et al.*, 1993) لدى إكثار ثلاثة أصناف من التفاح بالأنسجة حيث وجد أن طول النموات وعددها تناقص مع زيادة تركيز BA في الوسط. كما تتوافق هذه النتائج مع نتائج (Sarwar *et al.*, 1998) التي أشارت إلى أن التراكيز العالية من BA أدت لتناقص طول النموات ، كما بينت أن التراكيز العالية من Kin كان لها تأثير سلبي في معدل النمو. كما وجد (Pasqualetto *et al.*, 1986) عند إكثار أحد أصناف التفاح أن زيادة تركيز BA في وسط الإكثار تؤدي لتقليل تشكل النموات الجديدة، وهذا يتوافق مع نتائج هذه الدراسة. وقد أشار (Lane, 1978) في دراسة لإكثار صنف التفاح ماكنتوش إلى أن إضافة BA بتركيز 5 ميكرومول/ ليتر إلى وسط الإكثار أعطى أكبر عدد من النموات بينما أدت زيادة التركيز إلى 10 ميكرومول/ ليتر إلى ظهور أعراض سمية على النموات . وقد بين (Dunstan *et al.*, 1985) أن إضافة تراكيز عالية من BA إلى وسط الإكثار يعتبر عاملاً محدداً لتشكل النموات الجديدة، بالإضافة لدوره في تقليل المساحة الورقية للنموات. وبشكل عام، يمكن القول إن النتائج السابقة تتوافق إلى حد ما مع نتائج هذه الدراسة، والتي تظهر التأثير السلبي لزيادة تركيز السيتوكينين في وسط الإكثار عن التركيز المناسب، وخاصة فيما يتعلق بتأثيره السلبي على معدل النمو. ويمكن أن يفسر ذلك، بأن التراكيز العالية من الـ BA تلعب دوراً مثبطاً للبراعم الجانبية، وبالتالي يؤدي ذلك لتقليل تشكل النموات الجديدة. وقد أشار (Kataoka and Inoue, 1993) لدى إكثاره لأحد أصول التفاح نسيجياً إلى اختلاف استجابة النموات في مرحلة الإكثار باختلاف نوع وتركيز السيتوكينين المضاف للوسط، و أظهرت نتائج (Abbot and Whiteley, 1976)عند إكثار التفاح نسيجياً أن إضافة الكينيتين لوسط الإكثار وبتركيز أقل من 0.5 أو أكثر من 23 ميكرومول/ ليتر، تؤدي إلى خفض عدد النموات الجديدة بينما كانت النتيجة أفضل عند إضافته بتركيز يتراوح ما بين 2.5 و 5 ميكرومول/ ليتر. وهذا يتوافق جزئياً مع نتائج هذه الدراسة.

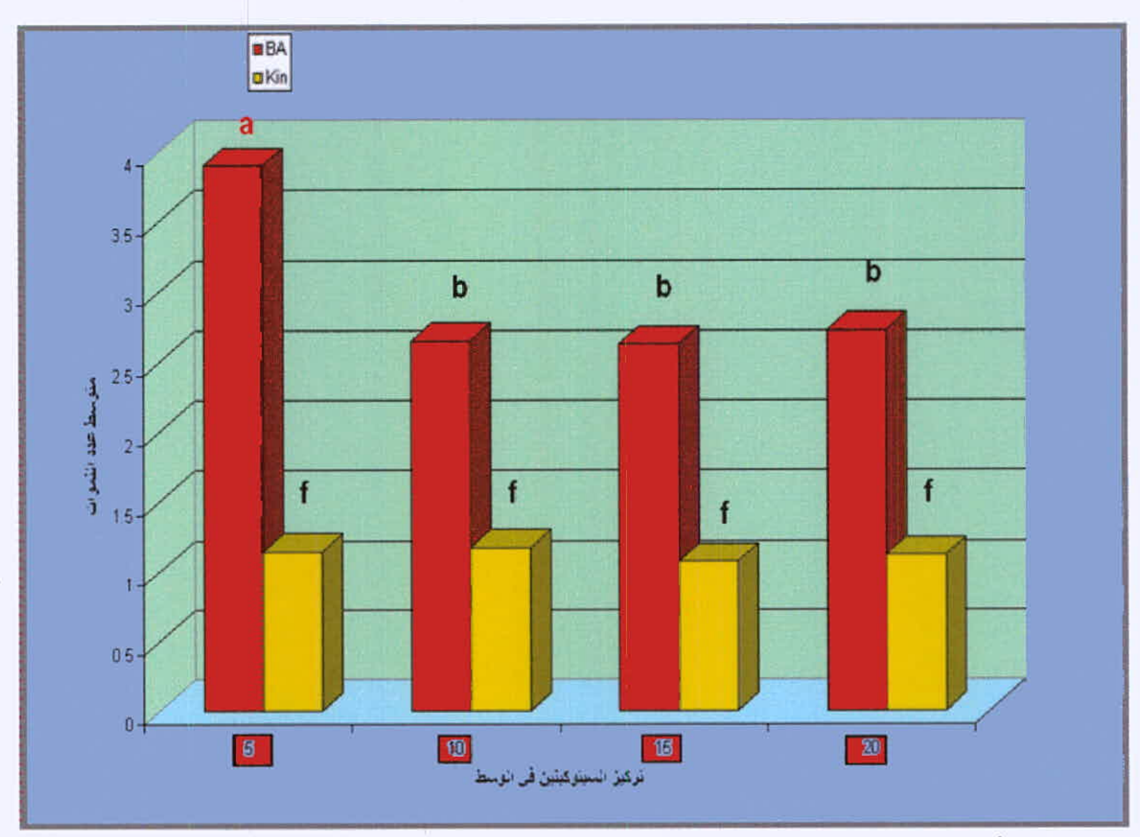
تلعب السيتوكينينات دور رئيسي في الحد من السيادة القمية وكسر سكون البراعم الجانبية وبالتالي زيادة عدد التفرعات الجانبية، فالسيتوكينين يشجع على انقسام واستطالة الخلايا وللحصول على أعلى معدل نمو يجب إضافة السيتوكينين بتراكيز مناسبة تختلف باختلاف النبات والجزء النباتي المزروع (Nordstorm and Eliasson, 1986)، كما أشارت النتائج التي توصل إليها (Hutchinson and Zimmerman, 1989) إلى أهمية السيتوكينين في زيادة معدل النمو. وعموماً يعتبر البنزيل أدينين BA من أكثر أنواع الستوكينينات استخداماً وأكثرها فعالية حسب ما أكده (Nordstorm and Eliasson, 1986) . كما بين (Hutchinson, 1984) أن الـ BA يحرض على تشكل النموات الجديدة أكثر من الستوكينينات الأخرى مثل : Zeatin, 2ip, Kin وقد أظهرت نتائج هذه الدراسة أن التركيز المثالي من BA اللازم لتكوين أكبر عدد من نموات الزعرور هو 5 ميكرومول / ليتر، وهذا يتوافق مع نتائج (Brown, 1975) الذي وجد عند إكثاره لبعض أصناف التفاح أن التركيز المثالي من BA في مرحلة الإكثار يختلف باختلاف الأصناف التي تنتمي لنوع واحد، كما تم تأكيد ذلك أيضاً من قبل (Karhu and Zimmerman, 1993) عند إكثارهما لمجموعة من أصناف التفاح نسيجياً، ويتوافق ذلك مع نتائج (Lane and Mcdougald, 1982) عند إكثارهما لمجموعة من أصول وأصناف التفاح، حيث وجدا أن التركيز المثالي من BA اللازم لتكوين أكبر عدد من النموات يختلف حسب الصنف والأصل المستخدم، وفي المجال نفسه فقد أيدت النتائج التي توصل إليها (Abdul-kader, 1992) عند إكثار مجموعة من أصناف التفاح نسيجياً نتائج هذا البحث إذ أشارت نتائجه إلى أن الهدف من الإمداد المستمر لـ BA في وسط الإكثار هو التغلب على السيادة القمية وتحريض تشكل النموات الخضرية الجديدة والتثبيط الكلي أو الجزئي لتشكل الجذور، كما وجد أن الـ BA أكثر كفاءة من Kin في مرحلة الإكثار.

وبالنسبة لتأثير تركيز السيتوكينين، فسرت النتائج التي توصل إليها (Keyes., 1980) اختلاف استجابة أصناف التفاح لتركيز السيتوكسينين المضاف لوسط الإكثار بعوامل وراثية تتعلق بالمحتوى الداخلي من منظمات النمو، وبالتالي يمكن القول إن التركيز المناسب من السيتوكينين في مرحلة الإكثار يختلف باختلاف النوع النباتي، فالتركيز المناسب لأحد الأنواع يمكن أن يكون تركيزاً زائداً وغير مناسب لأنواع أخرى. فقد بين (Jones, 1967) أن BA يلعب دوراً هاماً في زيادة عدد النموات الجديدة المتشكلة لنباتات التفاح المكاثرة نسيجياً، و وجد (Arello et al., 1991) عند إكثاره لأصل التفاح MMIII أن إضافة BA بتركيز مرتفع أدى لزيادة معدل النمو. بينما أظهرت النتائج التي توصل إليها (Modgi I *et al.*, 1999) عند إكثاره لأحد أصناف التفاح أن إضافة BA بالتركيز المنخفض إلى وسط الإكثار كان أفضل من التركيز المرتفع وذلك من حيث تأثيره على زيادة معدل النمو.

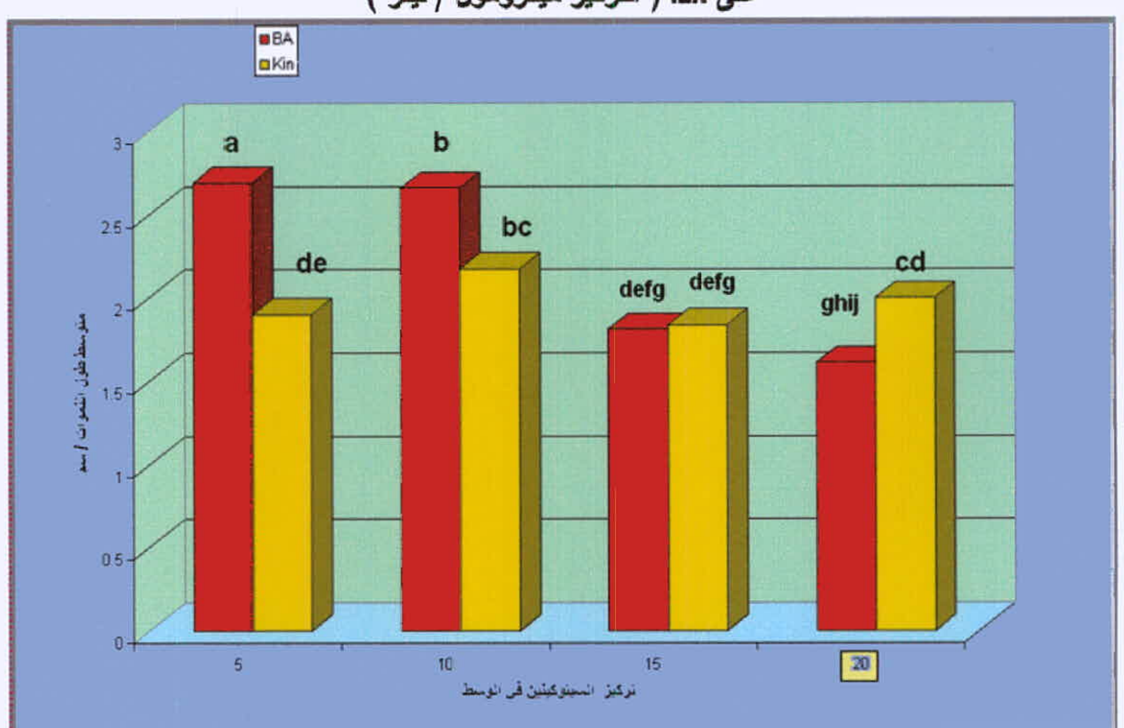
أما بالنسبة لمقارنة تأثير نوع السيتوكينين المضاف فقد بينت النتائج (الـشكلان 7 و 8) تفوق BA على Kin عند إضافته للوسط بنفس التركيز وبغض النظـر عـن نـوع الأوكـسين المضاف وذلك من حيث تأثيره في متوسط عدد النموات المتشكلة، وهذا يتطابق مع نتائج عدد كبير من الباحثين الذين أشاروا إلى اختلاف استجابة الأجزاء النباتية المزروعة باختلاف نـوع وتركيز السيتوكينين (Kataoka and Inoue, 1993; Elliott, 1972). مما يدعو للقول بـأن للـــ BA دور هام في تنشيط البراعم الجانبية والحد من السيادة القمية، وبالتالي زيادة عـدد التفرعـات الخضرية الجديدة عند إضافته لوسط الإكثار بالتركيز المناسب، وهذا يتفق أيضاً مع النتـائج التي توصل إليها (Sarwar *et al.*, 1998)، حيث بين تفوق BA علـى Kin عنـد إكثـار بعـض أصناف التفاح نسيجياً، كما تتفق نتائج هذا البحث مع نتائج (الريحاني، 2006) لـدى إكثـاره لمجموعة من أصول التفاح نسيجياً، والتي أظهرت أن إضافة BA إلى الأوسـاط الغذائيـة أدت إلى تحقيق معدلات إكثار عالية وبفروق معنوية بالمقارنة مع Kin وبغض النظر عن التراكيـز المستخدمة منهما، وتركيز ونوع الأوكسين المرافق.

من جهة ثانية، يعتبر تشكل الكالوس من الظواهر السلبية في زراعة الأنسجة لأنـه قـد يؤدي إلى ظهور تباينات وراثية. وقد أظهرت نتائج هذا البحـث أن زيـادة تركيـز BA فـي الوسط أدت لزيادة تشكل الكالوس عند قواعد النموات، حيث بلغـت نـسبة تـشكل الكـالوس (68، 85، 95 %) وذلك عند إضافة BA إلى الوسط بالتركيز (10، 15، 20 ميكرومول) على التوالي، بينما لم يلاحظ تشكل الكالوس عند زيادة تركيز Kin في الوسط، وقد أشارت بعـض الدراسـات إلـى دورالأوكـسين المـشجع علـى تـشكل الكـالوس حيـث بينـت نتـائج الدراسة التي قام بها (Okamura *et al.*, 1999) حول تحريض تشكل الكالوس في عقـل نـوع الزعرور *Crataegus cuneata* أن أعلى نسبة من الكالوس المتشكل كانـت عنـد اسـتخدام وسط MS الحاوي على NAA بتركيز أعلى من 10µM، كما أيدت نتـائج (Abdul-kader, 1992) لدى إكثاره لمجموعة من أصناف التفاح نسيجياً ذلك، وأظهرت أن زيادة تركيز BA في وسـط الإكثار بوجود NAA تؤدي إلى زيادة تشكل الكالوس على قواعد النمـوات وتقزمهـا، وهـذا يتوافق جزئياً مع نتائج هذه الدراسة.

ومن جهة أخرى، تعتبر ظاهرة الشفافية من الظواهر الفيزيولوجية السلبية التي تصيب النباتات التي يتم إكثارها نسيجياً، حيث تؤدي لتقزم النموات وتشوهها، وبالتالي تناقص معدل الإكثار (Ziv, 1991; Majada *et al.*, 2001). وفي هذه الدراسة، لوحظت ظاهرة الشفافية عند إضافة BA بتراكيز (15، 20 ميكرومول/ ليتر) إلى الوسط المغذي المحتوي على NAA. وهذا يتوافق مع النتائج التي توصل إليها (Pasqualetto *et al.*, 1986) حيث وجد أن إضافة تركيز عال من BA إلى وسط الإكثار أدى لحدوث ظاهرة الشفافية، كما تتوافق مع نتائج (PUA *et al.*, 1983) أيضاً الذي وجد أن إضافة تراكيز عالية من BA و NAA (5 ملغ/لتر لكل منهما) تؤدي إلى تشكل نموات مشوهة.

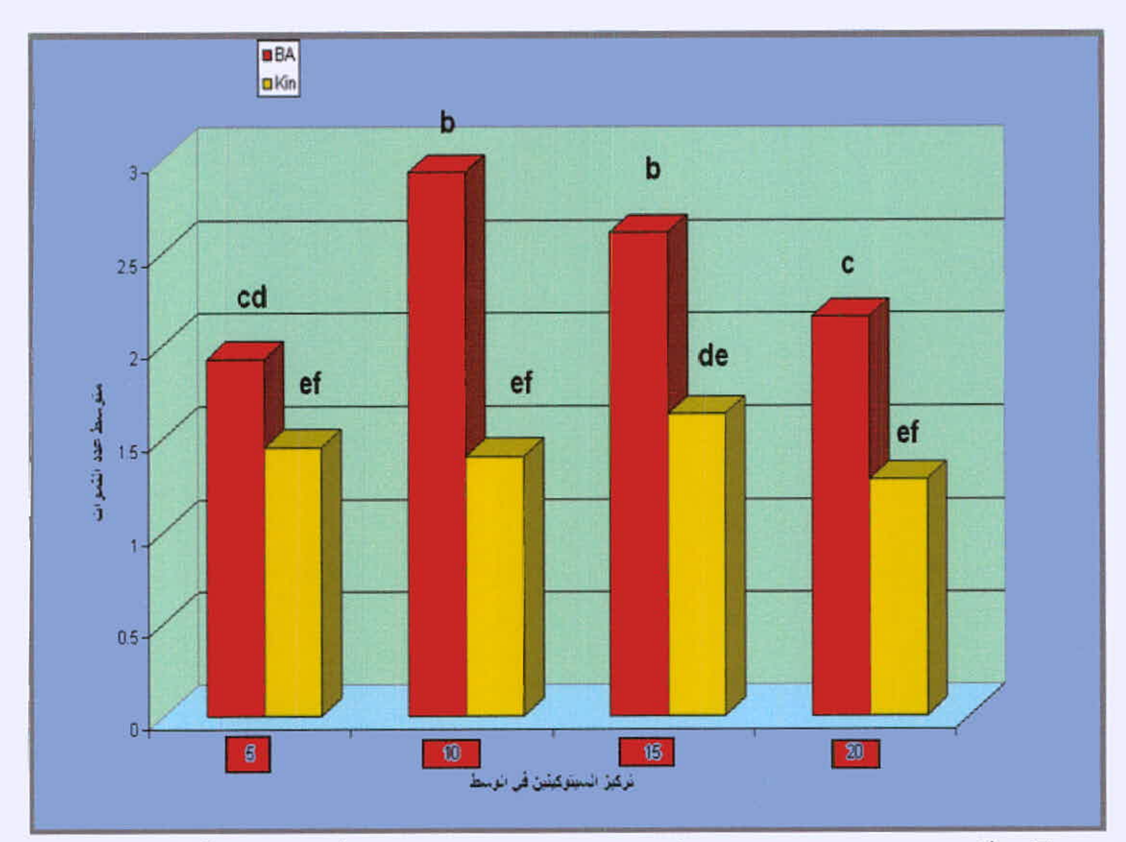


شكل (7). تأثير نوع وتركيز السيتوكينين في متوسط عدد النموات المتشكلة عند الزراعة في وسط يحتوي على IBA (التركيز ميكرومول / ليتر)

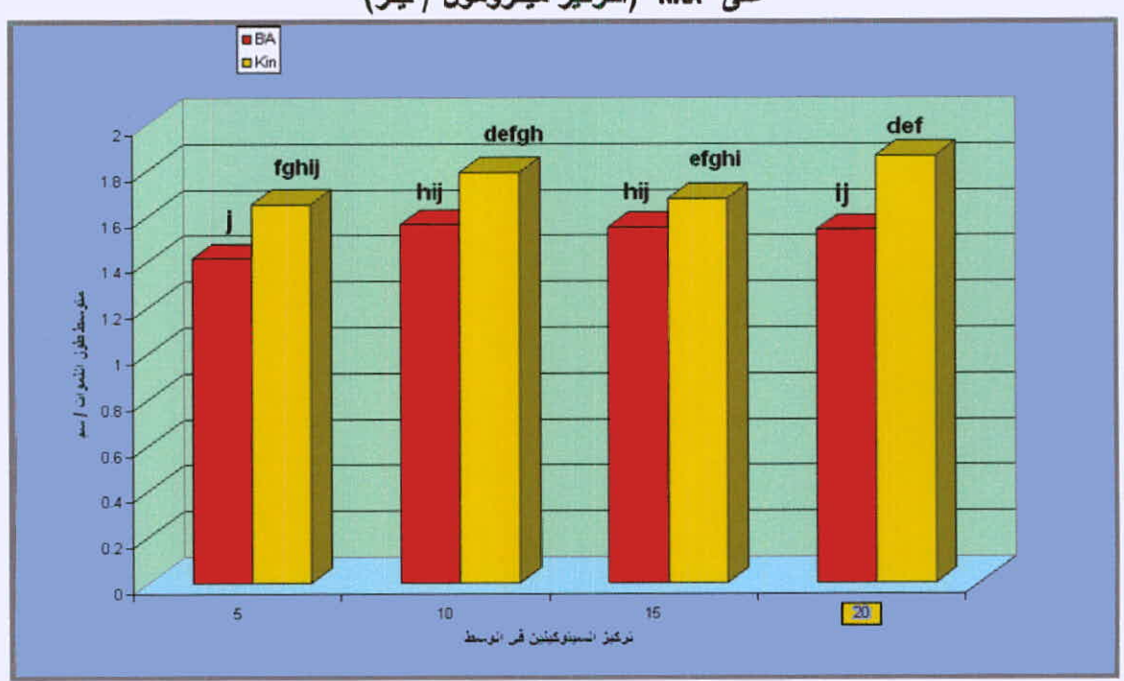


شكل (8). تأثير نوع وتركيز السيتوكينين في متوسط طول النموات المتشكلة عند الزراعة في وسط يحتوي على IBA (التركيز ميكرومول / ليتر)

ملاحظة : الأعمدة ذات الأحرف المشتركة غير مختلفة إحصائياً (أو معنوياً)



شكل (9). تأثير نوع وتركيز السيتوكينين في متوسط عدد النموات المتشكلة عند الزراعة في وسط يحتوي على NAA (التركيز ميكرومول / ليتر)



شكل (10). تأثير نوع وتركيز السيتوكينين في متوسط طول النموات المتشكلة عند الزراعة في وسط يحتوي على NAA (التركيز ميكرومول / ليتر)

ملاحظة : الأعمدة ذات الأحرف المشتركة غير مختلفة إحصائياً (أو معنوياً)

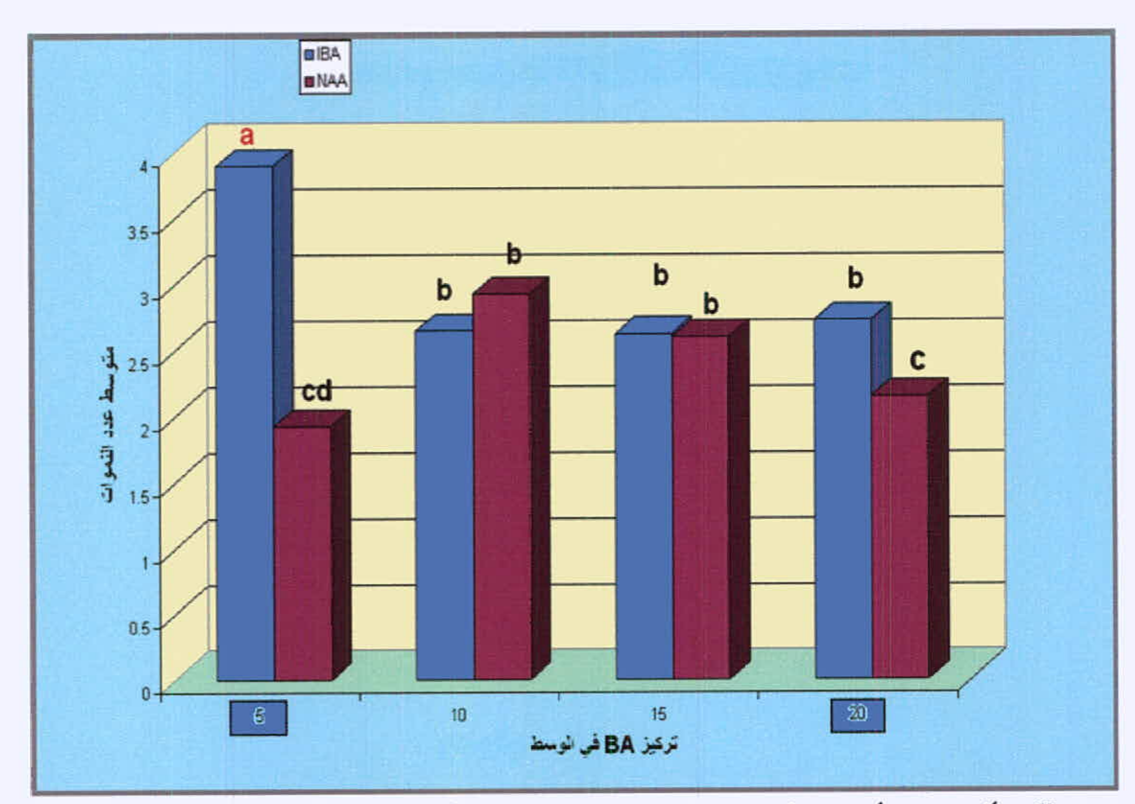
1-4- تأثير نوع الأوكسين في طول النموات وعددها:

تفوق IBA على NAA في الوسط المحتوي على BA بتركيز 5 µM، وذلك من حيث تـأثيره في متوسط طول النموات وعددها وبفروق معنوية، كما تفوق IBA أيضاً على NAA مـن حيث متوسط طول النموات وذلك في الوسط الذي يحتوي على BA بتركيز 15 µM، بينما لم يكن لنوع الأوكسين تأثير في متوسط عدد النموات وذلك في الوسط الذي يحتـوي علـى BA بـالتركيز المذكور، وعند إضافة BA إلى الوسط بتركيز 10 µM تفوق IBA على NAA من حيث تأثيره فـي متوسط عدد النموات المتشكلة بينما كانت الفروق ظاهرية من حيث التأثير في متوسط طـول النموات، كما أظهرت النتائج تفوق IBA على NAA بتأثيره في متوسط عدد النموات المتـشكلة وذلك في الوسط الذي يحتوي على BA بتركيز 20 µM، بينما كانت الفروق ظاهرية من حيـث التأثير في متوسط طول النموات. مما سبق يمكن الاستنتاج بأن IBA قد تفوق على NAA وذلـك من حيث تأثيره فـي متوسـط طـول النمـوات عنـد إضـافة BA إلـى وسـط الزراعـة بالتراكيز : 5، 10، 15 µM، كما تفوق أيضاً من حيث تأثيره في متوسط عدد النموات ولكن عند إضافة BA بالتركيزين : 5 و 20 µM. شكل (11 و 12).

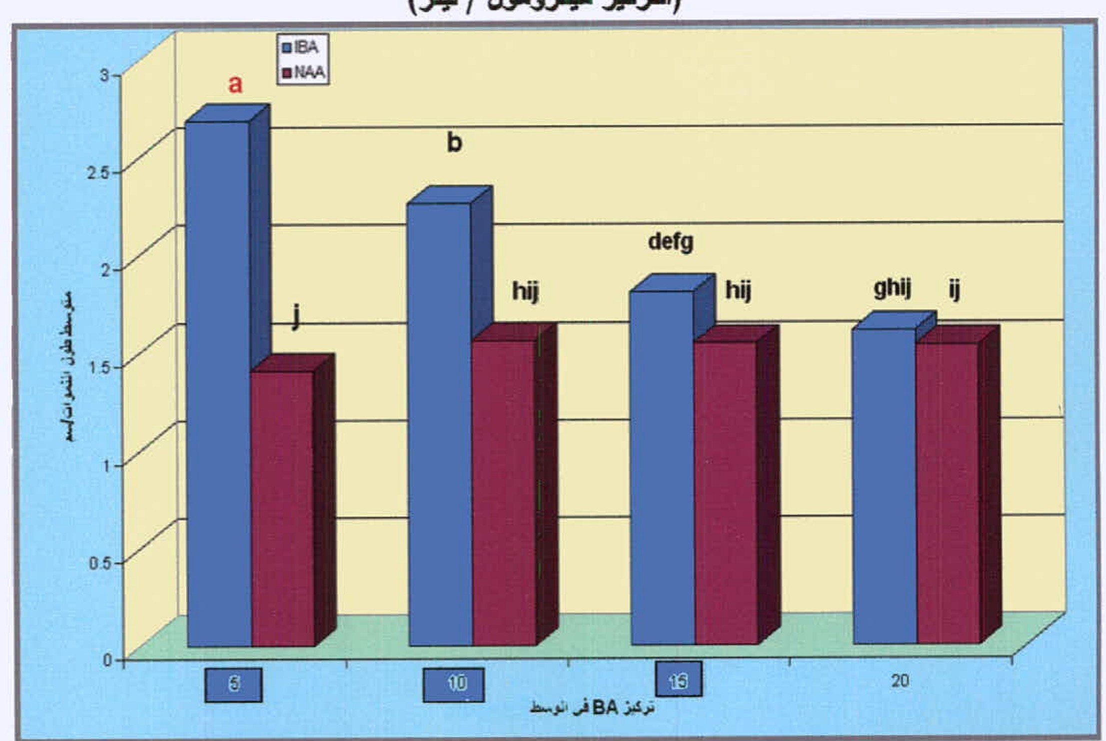
من جهة أخرى فقد تفوق IBA على NAA في الوسط الذي يحتوي على Kin بتركيـز 5 µM بتأثيره في متوسط طول النموات وبفروق معنوية، بينما كانت الفروق ظاهريـة مـن حيث التأثير في متوسط عدد النموات، بينما تفوق NAA على IBA من حيث التأثير في متوسـط عـدد النموات عند إضافة Kin إلى وسط الزراعة بتركيز 10 µM، بينما لوحظ تفوق IBA على NAA من حيث التأثير في متوسط طول النموات، ولكن لوحظ عدم تأثر متوسط طول النمـوات بنـوع الأوكسين المستخدم عند إضافة Kin إلى وسط الزراعة بتركيز 15 µM، بينما تفـوق NAA علـى IBA من حيث التأثير في متوسط عدد النموات. وعند إضافة Kin إلى وسط الزراعة وبتركيـز 20 µM، تبين أن متوسط عدد وطول النموات لم يتأثر بنوع الأكسين المستخدم . ممـا سـبق يلاحظ تفوق IBA على NAA من حيث تأثيره في متوسط طول النموات وذلك عنـد إضـافة Kin إلى وسط الزراعة بالتركيزين: 5 و 10 µM، بينما تفوق NAA على IBA من حيث التـأثير فـي متوسط عدد الأفرع عند إضافة Kin بالتركيزين: 10 و 15 µM (شكل 11).

استناداً إلى النتائج السابقة، يمكن القول أن تأثير نوع الأوكـسين فـي طـول النمـوات المتشكلة وعددها يرتبط بنوع وتركيز السيتوكينين المضاف للوسط، فعند إضافة BA أو Kin إلى الوسط بتركيز 5 أو 10 µM ، فإن IBA تفوق على NAA من حيث التأثير فـي متوسـط طـول النموات ويمكن أن يعزى ذلك إلى أن إضافة BA بالتركيز المذكور سابقاً وبوجود IBA قد أدى إلى تثبيط نمو البراعم الجانبية وتنشيط السيادة القمية، وعند إضافة BA بتركيز 15 µM، تفوق

IBA على NAA من حيث تأثيره في متوسط طول النموات، أمـا عنـد اسـتخدام Kin بـالتركيز نفسه، فقد لوحظ تفوق NAA على IBA من حيث التأثير في متوسط عدد الأفرع المتشكلة، بينمـا أدت إضافة BA إلى الوسط بتركيز 20 µM، إلى تفوق IBA على NAA من حيث متوسـط عـدد النموات، ولكن عند إضافة التركيز نفسه من الكينيتين لم يتأثر طول أو عدد النمـوات بنـوع الأوكسين المستخدم. ويمكن تفسير ذلك بأن إضافة BA بتركيز عالٍ مع وجـود IBA أدى إلـى تنشيط وتحفيز البراعم الجانبية على النمو، مما يؤدي إلى زيـادة عـدد النمـوات الخـضرية الجديدة المتشكلة، وهذا يتوافق إلى حد ما مع النتائج التي توصل إليها الريحـاني عـام 2006. شكل (13 و 14).

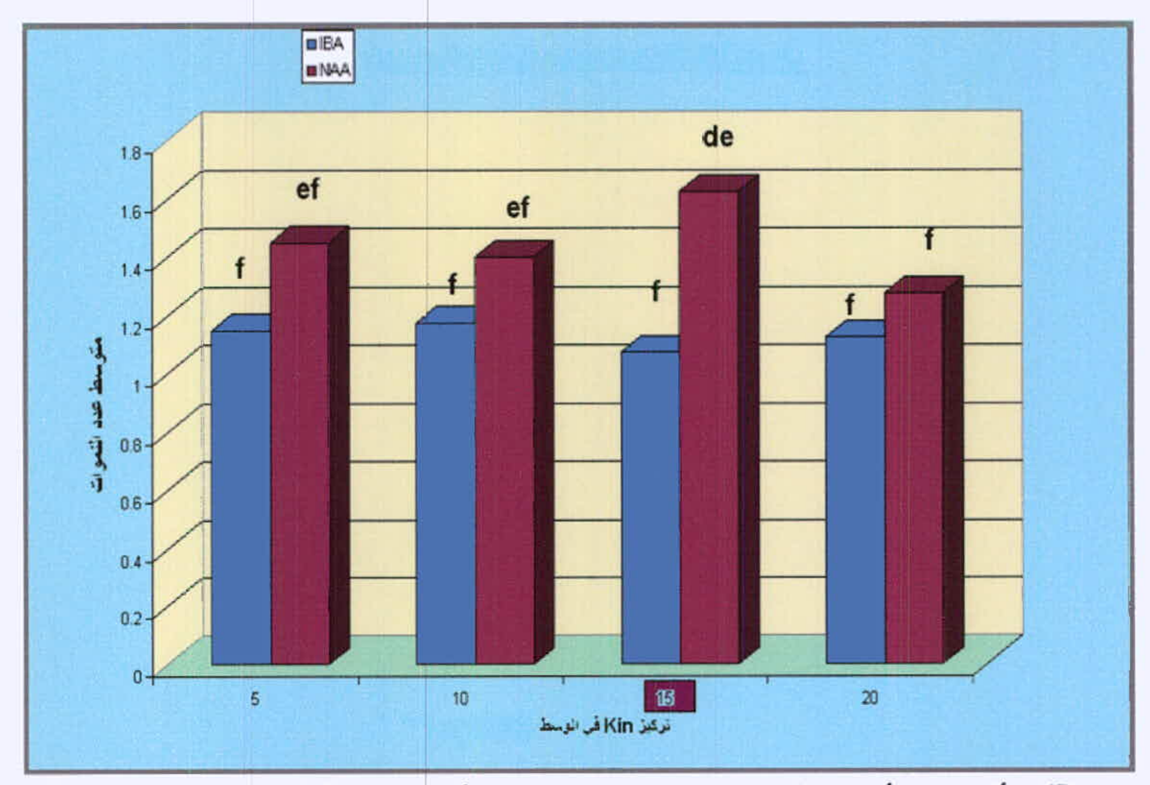


شكل (11). تأثير نوع الأوكسين في متوسط عدد النموات المتشكلة عند الزراعة في وسط يحتوي على BA (التركيز ميكرومول / ليتر)



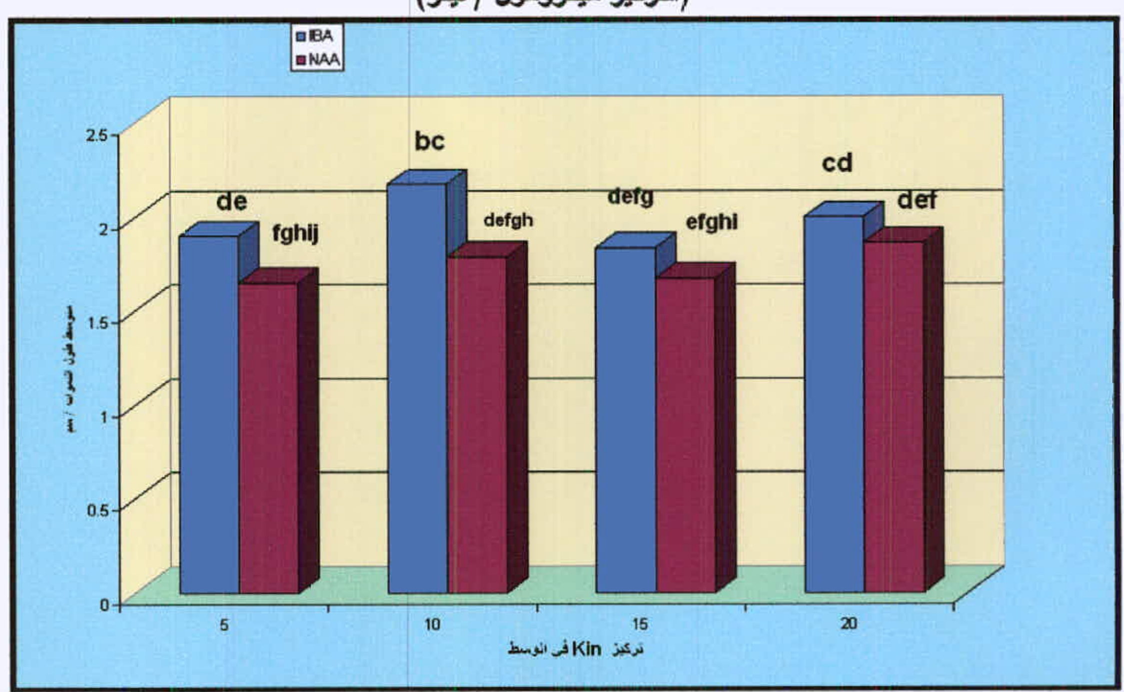
شكل (12). تأثير نوع الأوكسين في متوسط طول النموات المتشكلة عند الزراعة في وسط يحتوي على BA (التركيز ميكرومول / ليتر)

ملاحظة : الأعمدة ذات الأحرف المشتركة غير مختلفة إحصائياً (أو معنوياً)



شكل (13). تأثير نوع الأوكسين في متوسط عدد النموات المتشكلة عند الزراعة في وسط يحتوي على Kin

(التركيز ميكرومول / ليتر)



شكل (14). تأثير نوع الأوكسين في متوسط طول النموات المتشكلة عند الزراعة في وسط يحتوي على Kin

(التركيز ميكرومول / ليتر)

ملاحظة : الأعمدة ذات الأحرف المشتركة غير مختلفة إحصائياً (أو معنوياً)

1-5- تجذير النموات الخضرية:

تكونت الجذور فقط في الوسط الذي يحتوي على IBA بتركيز (9,80 ميكرومول / ليتـر) بينما لم يلاحظ تشكل الجذور في بقية الأوساط المختبرة، وقد بلغت نسبة التجذير في الوسط المذكور 45% فقط، وبلغ متوسط طول الجذور (4 سم) ومتوسط عدد الجذور (4,5 جذر). كما لوحظ تشكل الكالوس على قواعد النموات الخضرية عند إضـافة IBA إلـى وسـط التجـذير بتركيز (14,70 ميكرومول/ ليتر) جدول (11).

يعتبر IBA من منظمات النمو الأساسية المستخدمة في تجذير النباتات المكاثرة نسيجياً. وقد أشارت كثير من الدراسات إلى أهمية إضافة IBA بهدف تجذير نموات التفاح المكاثر نسيجياً (James and Thurbon, 1979; Jones et al 1977)، وقد بينت الدراسات المرجعية اختلافاً في تركيز IBA المناسب لتشكل الجذور عند إكثار النباتات نسيجياً، فقد أشار (Chong, 1981) إلى أهمية وأفضلية استخدام تراكيز عالية من IBA للحصول على نسبة تجذير جيدة عند بعض الأنواع صعبة التجذير. وأكد (Pua *et al.,* 1983) هذه النتائج في دراسته لإكثار أصل التفاح Ottawa نسيجياً، حيث حصل على نسبة تجذير 100% عند إضافة IBA بتركيز 6.25 ملغ/ليتر إلى وسط التجذير، ولكن مع تشكل كالوس عند قواعد النموات، وهذا يختلف مع نتائج هذه الدراسة التي اظهرت أن إضافة تركيز مرتفع من IBA (14,7 ميكرومول/ليتر)، أثرت سلباً في التجذير إذ لوحظ تشكل كالوس على قواعد النموات الخضرية، وعدم تشكل الجذور، ويمكن أن يعزى ذلك إلى اختلاف النوع النباتي المزروع.

كما تشير بعض الدراسات، إلى أن إضافة الأوكسين بتراكيز منخفـضة خـلال مرحلـة تجذير النباتات المكاثرة نسيجياً أعطت نتائج أفضل من إضافته بتراكيز عالية ، فقـد أظهـرت النتائج التي توصل إليها (Branislava and Ljilana, 1987) أن إضافة IBA بتركيـز 1 ملـغ/ليتـر أعطت أفضل النتائج عند تجذير نموات التفاح المخبرية، كما تتفق هـذه النتـائج مـع نتـائج (Hong *et al*, 1987) عند إكثار الزعرور *C. scabrifolia* نسيجياً، إذ وصلت نسبة التجذير إلى 80% عند استخدام وسط تجذيرMS يحتوي على IBA أو IAA بتركيز 0.05- 1 ملغ/ليتر، كمـا تتوافق هذه النتائج أيضاً مع نتائج (Rajesh and Bist, 2002) عند إكثار الزعرور *Crataegus oxyacantha* نسيجياً، إذ وجد أن أفضل وسط تجذير هو وسط 1/2MS المحتوي على IBA بتركيز 0.2 ملغ/ليتر و NAA بتركيز 0.2 ملغ/ليتر.

كما تتوافق نتائج هذا البحث جزئياً مع النتائج التي توصل إليها (Shizhou *et al*, 1987) لـدى دراسة بعض العوامل المؤثرة في تجذير نموات الزعرور *C. scabrifolia* المخبريـة حيـث

وجد أن نسبة التجذير كانت 50% عند الزراعة في وسط 1/2MS يحتوي على IBA أو NAA بتركيز 0.01-1 ملغ/ليتر.

كما بينت الدراسة الحالية، أن استخدام IBA بتركيز منخفض (4.90 ميكرومول/ليتر)، لم يكن فعالاً في تشكل الجذور، ويمكن أن يعزى ذلك لأسباب وراثية تتعلق بحاجة النوع النباتي لمنظمات النمو الخارجية. بينما تبين أن إضافة IBA بتركيز (80.9 ميكرومول/ليتر)، كان له دور محفز لتشكل الجذور.

كما أشارت بعض الدراسات إلى تأثير فترة بقاء النموات في وسط التجذير للحصول على نسبة تجذير أفضل، فقد بين (Klerk *et al.* 1990) أن وجود الأوكسين ضروري خلال الطور الأول من عملية التجذير لكنه يحد من نمو الجذور في مرحلة لاحقة، كما وجد (Dai *et al.* 2007) لدى دراسته لتجديد نموات الزعرور نسيجياً من أوراق بعض الأصناف التابعة للنوع *Crataegus pinnatifida*، أن طريقة التجذير على مرحلتين هي الأفضل، حيث تزرع النموات بطول 2 سم في الوسط المغذي 1/2MS مضافاً له IBA بتركيز 19.68 µM لمدة 4 أيام وفي المرحلة الثانية، تنقل النموات لتزرع على الوسط المغذي نفسه ولكن بدون إضافة هرمونات وبذلك كانت نسبة نجاح التجذير 50% ونسبة نجاح التقسية 80%، كما أشارت بعض الدراسات أيضاً، إلى تأثير بعض العوامل في تحسين نسبة التجذير حيث قام (Wawrosch *et al.*, 2007) بدراسة لتجذير نموات الزعرور *Crataegus monogyna, Jacq.* المكاثر نسيجياً، بغمس قواعد هذه النموات بمسحوق التجذير Seradix® B3، ثم زراعتها في التربة داخل حاضنات رطبة بعد ذلك نقلت إلى البيت الزجاجي لمتابعة عملية التقسية. كما تمكن (Haapala, 2004) من التغلب على مشاكل تجذير الأنواع الخشبية المكاثرة نسيجياً ومنها جنس الزعرور، بنقل الـ Rol-gene بواسطة بكتريا *Agrobaterium rhizogenesis* إلى النباتات المكاثرة بالأنسجة، مما ساهم في تحسين نسبة التجذير وذلك بزيادة عدد الجذور والمسطح الجذري ، وبشكل عام يمكن القول: بأن نسبة نجاح التجذير في هذه الدراسة التي وصلت إلى 45%، هي نسبة منخفضة نسبياً ولا بد من دراسة تأثير مزيد من العوامل لرفع هذه النسبة مثل: (استخدام الأوساط السائلة، إضافة الفحم المنشط، التجذير على مرحلتين وغيرها من العوامل الأخرى التي يمكن أن تساهم في رفع نسبة التجذير مخبرياً).

جدول (11). تأثير أوساط التجذير المختلفة في تجذير نموات الزعرور *Crataegus azarolus*, L.

رمز الوسط	تركيب الوسط	طول الجذر الرئيس / سم	عدد الجذور	نسبة التجذير %
R1	MS + 14,70 IBA	0.000c±0.000	0.000b±0.000	0
R2	MS + 9,80 IBA	4.000b±0.121	4.500a±0.120	45
R3	MS + 4,90 IBA	0.000c±0.000	0.000b±0.000	0
R4 (الشاهد)	MS	0.000c±0.000	0.000b±0.000	0
LSD 0.05		0.280	0.400	

1-6- التقسية وأقلمة النباتات المجذرة:

استغرقت عملية تقسية النباتات المجذرة ثمانية أسابيع وبلغت نسبة نجاح النباتات المقساة في البيت الزجاجي 60% شكل (14).

أشار (Brainerd and Fuchigami, 1981) إلى حساسية النباتات المكاثرة بالأنسجة للظروف البيئية الخارجية. كما بين (Broome and Zimmerman, 1985) أهمية التدرج في تقسية النباتات المكاثرة نسيجياً، وذكر (Bolar *et al.*, 1998) لدى تقسية نباتات التفاح المكاثرة بالأنسجة أن نسبة نجاح التقسية وصلت إلى 70 % وهذا يتفق نسبياً مع نتائج هذه الدراسة.

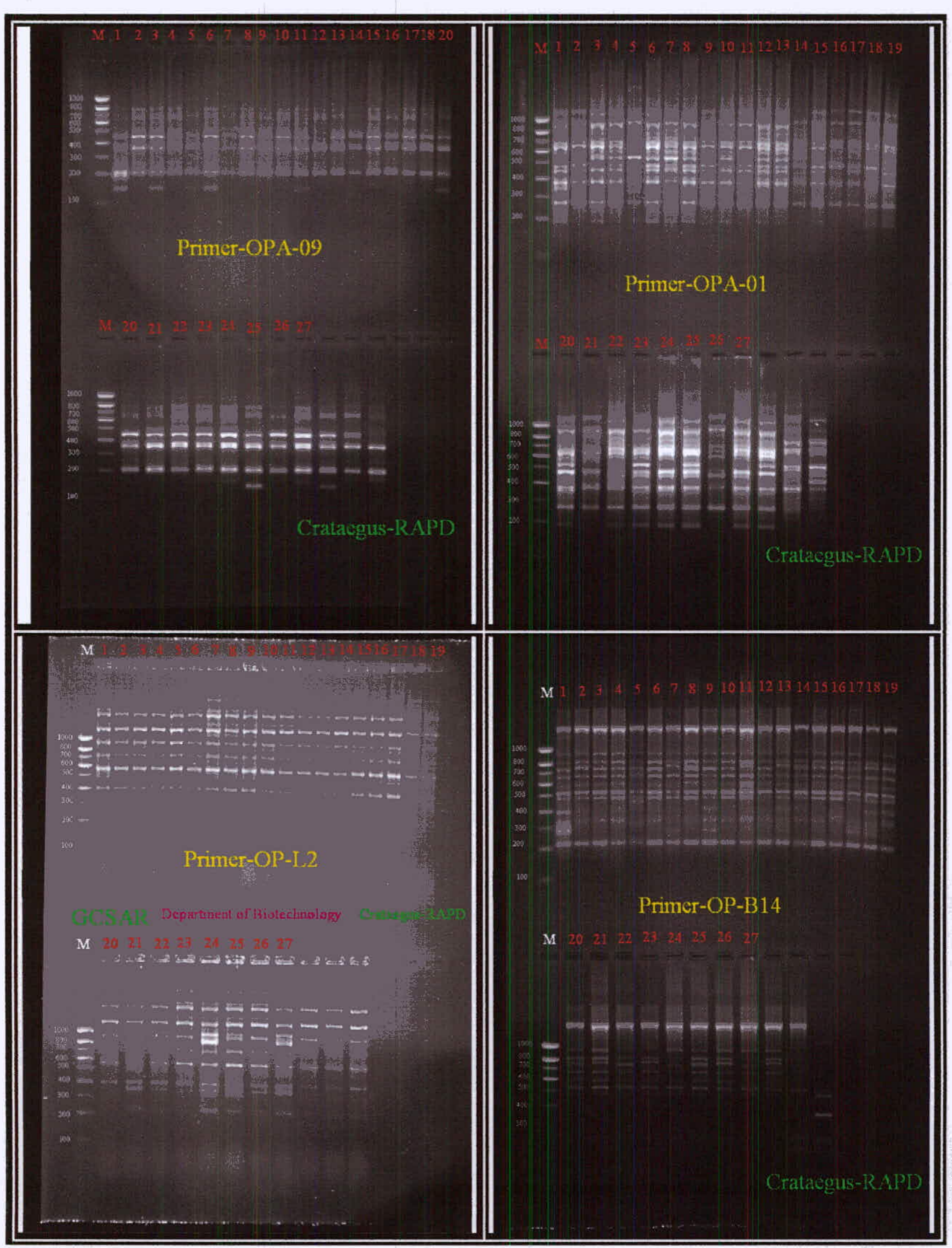


شكل (15). مراحل التجذير والتقسية لنبيتات الزعرور *Crataegus azarolus,* L. الناتجة عن الإكثار المخبري

2- التوصيف الجزيئي:

2-1- التباينات(polymorphism) الناتجة عن تطبيق تقنية الـRAPD في دراسة الطرز المدروسة:

جرى اختبار 64 مرئساً على عينات الزعرور المستخدمة في الدراسة ، حيث أظهـرت 52 منها كفاءة في كشف التباينات الوراثية بين الطرز المدروسة. لقد كان العدد الكلي لحـزم الـ DNA التي تم كشفها في كافة الطرز المدروسة من قبل المرئسات المستخدمة 507 حزم. كان عدد قطع الـ DNA المشتركة والمتماثلة في الطرز المدروسة كافةً هو 256 حزمة، فـي حين كان عدد الحزم المتباينة هو251 حزمة، حيث بلغت نسبة الحزم المتباينة 48.37 %.
تراوح عدد الحزم التي تم كشفها في العينات من حزمتين من الـ DNA باسـتخدام المـرئس OPD-19 حتى وصل إلى 19 حزمة باستخدام المرئس OPB-14. قدر متوسط عدد حزم الـ DNA التي تم كشفها باستخدام المرئس الواحد بـ 9.75 حزمة، وكان متوسط عدد الحـزم المتباينـة 4.82 حزمة.
تباين عدد حزم الـ DNA المكتشفة تبعاً للطراز المدروس، حيث أظهر الطراز رقم (1) أعلى عدد من الحزم (395 حزمة)، في حين أعطى الطراز رقم (14) أقل عدد من الحزم (336 حزمة) جدول (12).



شكل (16). نماذج التباين في الحزم الناتجة عن استخدام مرئسات متنوعة في طرز الزعرور البرية المنتشرة في ريف دمشق *Crataegus azarolus,* L.

ملاحظة: الأرقام من 1 إلى 27 تمثل الطرز البرية المدروسة

جدول (12). عدد الحزم (Band) الكلي، وعدد الحزم المتباينة والنسبة المئوية للحزم المتباينة الناتجة عن المرئسات المستخدمة في تقنية الـــRAPD في الطرز البرية المدروسة للزعرور *Crataegus azarolus*, L. المنتشر في ريف دمشق

النسبة المئوية للحزم المتباينة	عدد الحزم المتعددة شكليا	عدد الحزم الناتجة	المرئس
84.6	11	13	OPA-01
62.5	10	16	OPA-02
70	7	10	OPA-04
80	8	10	OPA-05
33.3	1	3	OPA-06
40	2	5	OPA-07
20	1	5	OPA-08
60	3	5	OPA-09
45.4	5	11	OPA-10
63.6	7	11	OPA-11
42.8	6	14	OPA-12
25	1	4	OPA-13
83.3	10	12	OPA-15
66.6	2	3	OPA-16
50	5	10	OPA-17
54.5	6	11	OPA-18
20	1	5	OPA-19
46.1	6	13	OPA-20
71.4	5	7	OPB-05
28.6	2	7	OPB-06
41.7	5	12	OPB-07
57.9	11	19	OPB-14
47	8	17	OPB-15
57.1	8	14	OPB-16
28.6	2	7	OPC-03
60	3	5	OPC-12
60	6	10	OPC-13
60	3	5	OPC-14
25	2	8	OPC-15
40	6	15	OPC-16
20	2	10	OPC-11
100	2	2	OPD-19
33.3	3	9	OPD-20
42.8	3	7	OPE-01
57.1	8	14	OPE-17
50	6	12	OPE-12
11.1	1	9	OPE-11
33.3	1	3	OPE-10
58.3	7	12	OPE-19
66.6	6	9	OPE-16
14.3	1	7	OPE-18
61.5	8	13	OPE-13
57.1	8	14	OPF-03
66.7	4	6	OPJ-10
42.9	3	7	OPJ-11
42.9	6	14	OPJ-18
27.3	3	11	OPJ-19
37,5	3	8	OPL-01
47	8	17	OPL-02
40	4	10	OPL-03
27,3	3	11	OPL-18
53.3	8	15	OPL-19
	251	507	المجموع
48.37	4.82	9.75	المتوسط

2-2- تمييز بعض الطرز البرية للزعرور باستخدام قطع الـ DNA الناتجة عن استخدام تقنية الـ RAPD :

سمحت تقنية الـ RAPD بتمييز عشر طرز وراثية من الزعرور اختلفت عن بعضها البعض في عدد قطع الـ DNA المكتشفة وكذلك في وزنها الجزيئي. مكنتنا هذه التقنية من إيجاد مؤشرات متخصصة بتمييز هذه الطرز، حيث وجد فيها قطع معينة من الـ DNA تسمح بتمييزها عن غيرها، لذلك تعتبر هذه القطع من الـ DNA مؤشرات متخصصة ومميزة للطراز، أي أن هذه القطع تواجدت في طراز معين وغابت من الطرز الأخرى. على سبيل المثال، نجد بأن تحليل الطراز 5 باستخدام المرئس OPA-02 يعطي ثلاث قطع من الـ DNA ذات وزن جزيئي يقدر بـ 500, 750, 1100bp، وجدت هذه القطع في هذا الطراز فقط ولم توجد في أي طراز آخر، وبالتالي يمكن باستخدام مرئسات معينة تمييز بعض الطرز عن بعضها البعض، وبالتالي تساهم هذه القطع بتحديد بصمة وراثية مميزة للطراز جدول (13).

جدول (13): المرئسات المميزة لبعض الطرز البرية للزعرور *Crataegus azarolus*, L.

رقم الطراز	المرئس	الوزن الجزيئي (b.p)
5	OPA-02	1100
	OPA-02	750
	OPA-02	500
	OPA-11	450
	OPA-19	350
	OPE-12	590
	OPB-14	450
7	OPD-20	1300
20	OPA-04	600
	OPA-04	250
	OPA-04	200
8	OPA-12	290
6	OPA-15	600
	OPA-15	350
19	OPE-12	500
2	OPE-12	190
13	OPB-07	230
16	OPB-14	350
1	OPA-01	350
	OPA-02	250
	OPA-04	550
	OPA-12	450
	OPA-18	180
	OPE-17	280
	OPE-11	390
	OPB-05	270
	OPB-07	550
	OPB-14	1300
	OPB-15	180
	OPB-16	290
	OPB-16	200

3-2- تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز البرية المدروسة:

جرى تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز البرية المدروسة بالاعتماد على معامل Jacard، وكانت أعلى درجة قرابة وراثية (0.952) بين الطرازين (27) و (24)، وأقل درجة قرابة وراثية (0.678) بين الطرازين رقم (5) و رقم (1)، جدول(14).

ومما تجدر الإشارة إليه هو الأهمية الكبيرة لتحديد درجة القرابة الوراثية بين وضمن الأنواع في برامج التحسين الوراثي، وذلك من خلال تقليل عدد المدخلات المستخدمة في التهجين، والاعتماد على الطرز المتباعدة وراثياً، والتي تؤمن الحصول على قاعدة وراثية كبيرة (Muzher, 2004).

جدول (14) درجة التشابه الوراثي بين الطرز البرية للزعرور . *Crataegus azarolus,* L

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	1																										
2	0.81	1																									
3	0.80	0.89	1																								
4	0.79	0.88	0.88	1																							
5	0.67	0.74	0.74	0.76	1																						
6	0.78	0.86	0.86	0.86	0.73	1																					
7	0.73	0.83	0.80	0.82	0.83	0.80	1																				
8	0.83	0.86	0.86	0.85	0.72	0.85	0.80	1																			
9	0.81	0.88	0.86	0.88	0.75	0.86	0.83	0.87	1																		
10	0.82	0.90	0.88	0.86	0.74	0.87	0.82	0.87	0.89	1																	
11	0.78	0.86	0.87	0.88	0.72	0.85	0.80	0.85	0.86	0.88	1																
12	0.78	0.85	0.86	0.86	0.74	0.86	0.77	0.86	0.84	0.85	0.87	1															
13	0.79	0.85	0.85	0.84	0.72	0.87	0.78	0.86	0.85	0.86	0.88	0.886	1														
14	0.73	0.80	0.79	0.81	0.80	0.77	0.81	0.78	0.81	0.80	0.79	0.79	0.77	1													
15	0.80	0.85	0.86	0.85	0.71	0.87	0.75	0.86	0.86	0.86	0.84	0.86	0.84	0.78	1												
16	0.78	0.85	0.83	0.82	0.74	0.84	0.80	0.83	0.86	0.86	0.84	0.84	0.82	0.81	0.87	1											
17	0.78	0.84	0.83	0.82	0.71	0.82	0.77	0.83	0.86	0.84	0.84	0.84	0.83	0.79	0.84	0.86	1										
18	0.80	0.85	0.85	0.84	0.72	0.85	0.79	0.87	0.85	0.85	0.86	0.86	0.86	0.77	0.84	0.84	0.85	1									
19	0.78	0.84	0.83	0.84	0.75	0.84	0.82	0.84	0.86	0.85	0.85	0.85	0.83	0.82	0.84	0.87	0.83	0.86	1								
20	0.78	0.84	0.83	0.85	0.78	0.84	0.81	0.81	0.84	0.88	0.83	0.83	0.81	0.79	0.83	0.84	0.79	0.82	0.83	1							
21	0.78	0.82	0.83	0.84	0.71	0.84	0.76	0.83	0.85	0.84	0.85	0.86	0.85	0.79	0.84	0.85	0.85	0.86	0.83	0.82	1						
22	0.78	0.85	0.84	0.85	0.73	0.84	0.77	0.84	0.83	0.87	0.83	0.86	0.85	0.75	0.86	0.81	0.80	0.84	0.83	0.83	0.84	1					
23	0.78	0.84	0.8	0.84	0.76	0.82	0.81	0.82	0.83	0.84	0.82	0.82	0.82	0.78	0.81	0.81	0.79	0.83	0.83	0.86	0.79	0.82	1				
24	0.79	0.83	0.83	0.82	0.69	0.82	0.74	0.83	0.83	0.85	0.82	0.86	0.84	0.78	0.84	0.81	0.84	0.83	0.82	0.80	0.85	0.84	0.80	1			
25	0.79	0.85	0.86	0.85	0.74	0.87	0.80	0.86	0.87	0.86	0.84	0.86	0.83	0.78	0.87	0.85	0.84	0.86	0.86	0.85	0.84	0.85	0.83	0.86	1		
26	0.76	0.81	0.83	0.83	0.73	0.81	0.76	0.82	0.83	0.81	0.83	0.87	0.85	0.79	0.84	0.84	0.84	0.84	0.86	0.81	0.87	0.84	0.81	0.84	0.85	1	
27	0.80	0.83	0.83	0.82	0.69	0.82	0.74	0.82	0.84	0.85	0.81	0.85	0.83	0.78	0.85	0.81	0.83	0.84	0.83	0.81	0.86	0.85	0.80	0.95	0.83	0.82	1

4-2- التحليل العنقودي (Cluster Analysis) للطرز البرية للزعرور:

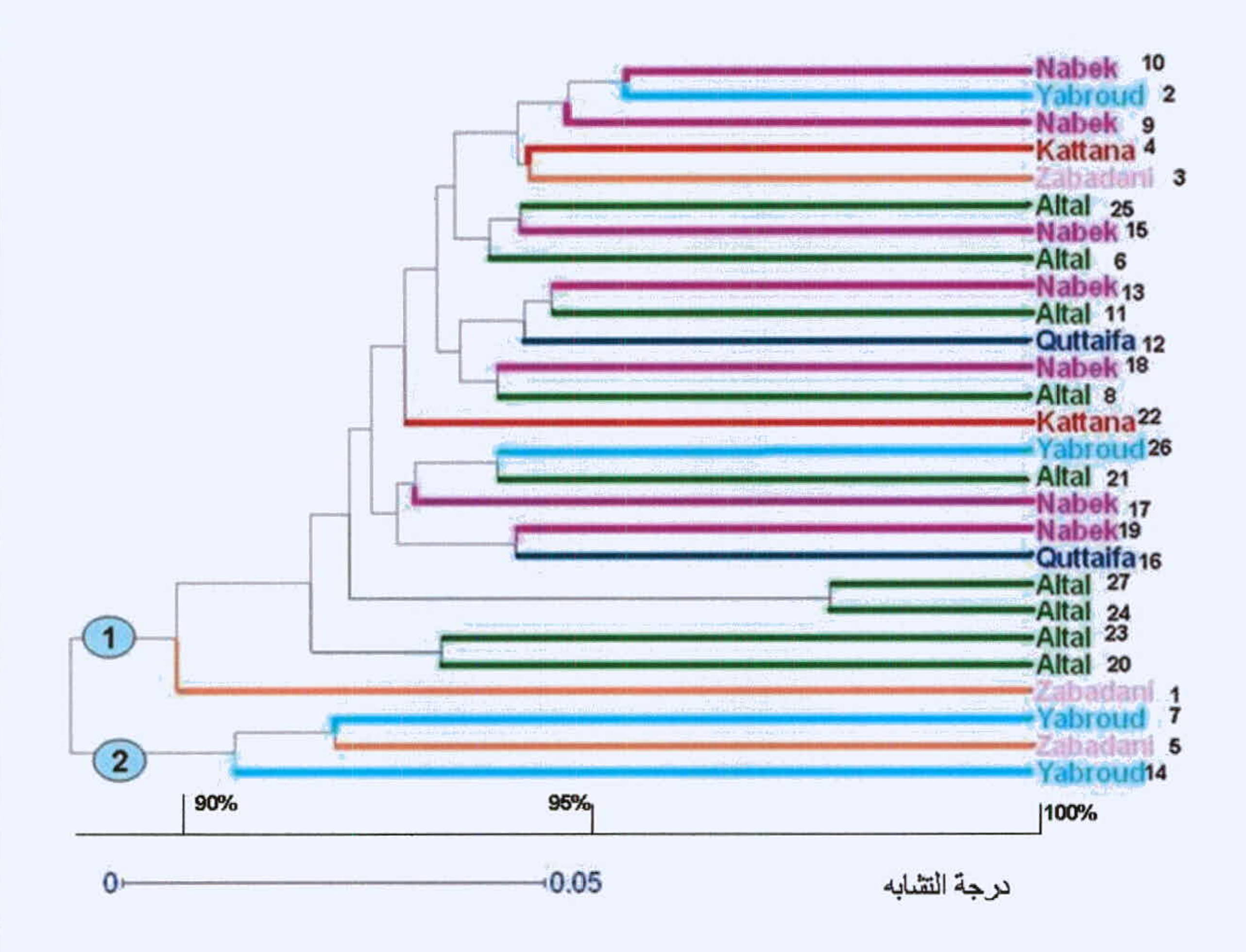
يمكن من خلال التحليل العنقودي تقسيم الأفراد المدروسة إلى مجموعات تبين درجة القرابة الوراثية بين الأفراد المدروسة، وقد تتجمع الأفراد المدروسة ضمن مجموعة واحدة بناءاً على موطنها الجغرافي، أو حسب أصلها ونسبها (Hormaza, 2002; Perez et al., 2005). لوحظ في الدراسة الحالية، بأن جميع الطرز المدروسة كانت مختلفة عن بعضها البعض، وبالتالي فإن معدل التشابه كان متباين بين الطرز المختلفة. استخدمت قيم التشابه الوراثي في رسم مخطط القرابة بين الطرز المدروسة، حيث أظهر المخطط شكل(17) و الجدول (15) توزع الطرز على مجموعتين أساسيتين، ضمت الأولى 24 طرازاً وضمت الثانية بقية الطرز الأخرى.

جدول(15): تقسيم الطرز البرية للزعرور *Crataegus azarolus*, L. المنتشر في ريف دمشق اعتماداً على شجرة القرابة الوراثية

المجموعة الرئيسية	تحت المجموعة الرئيسية	الطرز
الأولى	**تحت المجموعة الرئيسة الأولى**	12، 11، 13، 6، 15، 25، 3، 4، 9، 2، 10، 16، 19، 17، 21، 26، 22، 8، 18، 24، 27، 20، 23
	تحت المجموعة الرئيسة الثانية	1
الثانية		7، 5، 14

لوحظ بأن الطرز التابعة لكل مجموعة كانت تحمل اختلافات فيما بينها، وكانت هذه الاختلافات أكبر بين طرز المجموعة الأولى بالمقارنة مع الثانية، حيث كانت أعلى درجة اختلاف ضمن المجموعة الأولى بين الطرازين (26و1) حيث بلغت درجة التشابه بينهما (0.76)، وكانت أعلى درجة اختلاف ضمن المجموعة الثانية بين الطرازين (5 و14) حيث بلغت نسبة التشابه بينهما (0.80).

ومن خلال مقارنة المواقع الجغرافية للعينات المدروسة، نلاحظ عدم وجود ارتباط بين الموقع الجغرافي ودرجة القرابة بين الطرز المدروسة، حيث نجد بأن الطرز المجموعة من منطقة واحدة قد توزعت على عدة تحت مجموعات (كما في الطرز المجموعة من منطقة الزبداني)، شكل(17)، حيث نجد أن الطراز 5 يوجد في المجموعة الثانية والطرازين 1 و 3 في المجموعة الأولى وفي تحت مجموعتين مختلفتين وبعيدتين عن بعضهما البعض وراثياً، وهذا يختلف عن النتائج التي توصل إليها (Oliveira *et al.*, 1999).



شكل (17): شجرة القرابة الوراثية للطرز البرية المدروسة من الزعرور . *Crataegus azarolus*, L

ملاحظة : الأرقام (من 1 حتى 27) تمثل الطرز، والأسماء تمثل المناطق

الاستنتاجات والمقترحات

أولاً- الاستنتاجات

1- يمكن خفض نسبة التلوث إلى 36% عن طريق التعقيم السطحي بمحلول الكلوركس التجاري الذي يحتوي على هيبو كلوريت الصوديوم بنسبة 5.25 % وبتركيز 30 % ولمدة 15 دقيقة وذلك في حال استخدام العقل ذات البراعم الجانبية غير المتفتحة في الزراعة التأسيسية، والتعقيم بالمحلول السابق بتركيز 15 % ولمدة 15 دقيقة في حال استخدام البراعم المتفتحة.

2- أعطى استخدام وسط MS المحتوي على BA بتركيز 5 ميكرومول/ ليتر و IBA بتركيز 0.5 ميكرومول/ ليتر، معدل نمو قدره 4 نموات خلال شهر من الزراعة، وازداد هذا المعدل إلى 6 نموات مع تكرار الزراعات الثانوية حتى الزراعة الثانوية الخامسة، بينما أدت إضافة تراكيز عالية من السيتوكينين إلى وسط الإكثار إلى انخفاض معدل النمو وتشكل الكالوس على قواعد النموات.

3- أعطى استخدام وسط التجذير MS المحتوي على IBA بتركيز 9,80 ميكرومول/ليتر نسبة تجذير وصلت إلى 45 % بعد شهر من الزراعة.

4- مكنت تقنية RAPD من التوصيف الجزيئي لبعض الطرز البرية التابعة للزعرور *C. azarolus* L. المنتشرة في ريف دمشق، وتحديد درجة القرابة الوراثية بينها. كما أمكن تحديد مجموعة من الطرز الوراثية المتميزة مما ساهم في كشف التنوع الحيوي الكبير لطرز الزعرور المدروسة في ريف دمشق والتي يمكن استثمارها والاستفادة منها في المستقبل وخاصة في اكثار الطرز المحدودة الانتشار باستخدام طرائق زراعة الأنسجة النباتية من أجل الحفاظ عليها كمصدر وراثي هام.

5- لم يلاحظ وجود ارتباط بين الطرز القريبة من بعضها البعض وراثياً والمناطق التي جمعت منها العينات، حيث توزعت عينات المنطقة الواحدة على كامل أفرع مخطط القرابة.

ثانياً- المقترحات

- استثمار تقنية الإكثار الخضري الدقيق، التي وضعت نتيجة هذه الدراسة، في إكثار الطرز المتميزة والمهددة بالانقراض، و تطبيق هذه التقنية لإكثار أنواع الزعرور الأخرى الموجودة في سورية.

- متابعة التوصيف الجزيئي للأنواع الأخرى التابعة للجنس *Crataegus* في ريف دمشق ، وتحديد درجة القرابة الوراثية لهذه الأنواع مع النوع المدروس ومع الطرز الوراثية المتميزة، مع التأكيد على دراسة عدد أكبر من العينات والاستعانة بتقنيات أخرى في التوصيف الجزيئي (SSR, AFLP) ، وتوسيع هذا العمل ليشمل بقية المحافظات في سورية.

- تزويد المجمعات الوراثية في المراكز البحثية بالطرز الوراثية لأنواع الزعرور، وخاصة الطرز قليلة الانتشار والمهددة بالانقراض، مما يشكل مصدراً هاماً للمادة الوراثية، وهذا يسهم في حفظ وصيانة التنوع الحيوي لجنس الزعرور في سورية.

- العمل على دراسة الخصائص الإنتاجية والنوعية لهذه الطرز وإدخالها في برامج التحسين الوراثي لاستنباط الأصناف والأصول المتميزة.

الملخّـــص

جرى في هذا البحث دراسة العوامل المؤثرة على الإكثار الخضري الدقيق لنوع الزعرور *Crataegus azarolus*, L. للمساهمة في التوسع بزراعته وخاصة في المناطق الجافة بالإضافة إلى الاستفادة من استخداماته الطبية المتعددة.

استخدمت عقل تحتوي على برعم واحد أخذت من أشجار زعرور معمرة نامية تحت الشروط الطبيعية في رنكوس بريف دمشق، وعقمت سطحياً باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم أو هيبوكلوريت الكالسيوم أو كلوريد الزئبق وبتراكيز ولفترات زمنية مختلفة، ثم زرعت في أنابيب اختبار تحتوي وسط موراشيج وسكوغ بنصف تركيز العناصر الكبرى (1/2MS). وقد أعطت طريقة التعقيم باستخدام هيبوكلوريت الصوديوم وبتركيز 30% ولمدة 15 دقيقة أفضل نتيجة تعقيم بكفاءة 50%.

نقلت النموات الأولية من الزراعات السليمة غير الملوثة بعد ذلك، إلى وسط MS المحتوي على منظمات النمو (BA) أو (.Kin) بأربعة تراكيز (5، 10،15 و 20 ميكرومول/ ليتـــر) كل مع 0.5 ميكرومول IBA أو NAA مع 30 غ/ليتر سكروز، ومهلم بالأجار(7غ/ليتـــر) وعدلت حموضة الوسط إلى 5.7 قبل التعقيم بجهاز التعقيم الرطب (الأوتوكلاف) على درجة حرارة 121 مْ لمدة 20 دقيقة.

أعطى وسط الإكثار MS1 الذي يحتوي على BA بتركيز 5 ميكرومول/ ليتـــر مـــع 0.5 ميكرومول/ ليتر من IBA ، أعلى معدل إكثار، وبلغ متوسط عدد النمـــوات المتشـــكلة 3.9 ومتوسط طولها 2.69 سم، وذلك بعد أربعة أسابيع من الزراعة، وكان متفوقاً و بفرق معنوي على الكينيتن Kin عند نفس التركيز بمتوسط 1.15 نمو جديد، ومتوسط طول 1.9 سم.

أدت زيادة تركيز البنزيل أدنين BA في وسط الزراعة إلى انخفاض متوسط طول النمـــوات المتشكلة عند التراكيز 15 و20 ميكرومول/ ليتر، كما أدت التراكيز العالية من BA إلى تشكل الكالوس عند قواعد النموات. بينما تميزت النموات المزروعة على الأوساط الحاويـــة علـــى الكينيتين Kin بمسطح ورقي كبير نسبياً.

ازداد عدد النموات الجديدة المتشكلة على الوسط المثالي المذكور مع تكرار إعادة الزراعة حتى الزراعة الثانوية السادسة، إذ وصل عدد النموات المتشكلة الى 6 نمـــوات كـــل أربعـــة أسابيع.

جرى التجذير بنقل النموات الخضرية بطول 2–3 سم إلى وسط MS الحاوي على IBA بتركيز 14.7 ميكرومول/ ليتر، وبكفاءة 45% فقط.

نقلت النموات بعد تشكل الجذور على قواعدها ، إلى أصص تحوي مزيجاً بنسبة 2 :1 (حجم/حجم) من البيتموس والبيرليت، وغطيت بأكياس بلاستيكية شفافة، وجرت تقسيتها بتعريضها للظروف الخارجية تدريجياً خلال 4 اسابيع، ومن ثم نقلت النباتات للبيت الزجاجي لمتابعة عملية تقسيتها قبل نقلها إلى الأرض الدائمة لتزرع تحت الشروط الطبيعية .

من جهة ثانية، تم استخدام تقنية RAPD المعتمدة على التضخيم العشوائي لقطع الدنا المتباينة شكلياً بهدف التوصيف الجزيئي لمجموعة من الطرز البرية التابعة لنوع الزعرور . *C. azarolus* L والمنتشرة في ريف دمشق وتحديد درجة القرابة الوراثية بينها.

جمعت 27 عينة من 15 موقع في ريف دمشق وتم استخلاص الـ DNA من العينات اعتماداً على طريقة الـ CTAB مع الكثير من التعديلات. تمت مكاثرة الحمض النووي DNA بالـ PCR باستخدام 64 بادئة حسب شركة .OPERON Technologies, Inc. أبدت 52 بادئة منها كفاءة في إعطاء تباينات بين الطرز المدروسة، حيث أعطت هذه البادئات 507 حزمة كلية من بينها 256 حزمة متشابهة بنسبة تباين 48.37 %، و 251 حزمة غير متشابهة. بلغ متوسط عدد الحزم مع البادئة الواحدة 9.75 حزمة ومتوسط عدد الحزم المتباينة للبادئة 4.82 حزمة. تم تحديد درجة القرابة الوراثية بين الطرز المدروسة وتمثيلها بشجرة القرابة بناء على مصفوفة التشابه وفق طريقة UPGMA.

لم يلاحظ وجود ارتباط بين الطرز القريبة من بعضها البعض وراثياً والمناطق التي جمعت منها العينات، حيث توزعت عينات المنطقة الواحدة على كامل أفرع مخطط القرابة.

تساهم هذه الدراسة في حفظ التنوع الحيوي للزعرور حيث تسمح بتوصيف بعض الطرز الوراثية وبالتالي إكثار المتميزة منها ونشر زراعتها، خاصة وأن بعضها محدودة الانتشار وتتعرض إلى خطر الانقراض.

ABSTRACT

In the present study, factors affecting *in vitro* multiplication of Hawthorn *Crataegus azarolus*, L.. have been studied as a contribution in expanding its cultivation mainly in the dry areas as well as to benefit from its multi-medical uses.

Shoot cuttings with single nodes and axillary buds, excised from adult trees grown in the field under natural conditions in Rankous, Damascus countryside were used as primary explants which were surface-disinfected using $HgCl_2$ or with sodium or calcium hypochlorite followed by three rinses with sterile distilled water before being cultured in test tubes containing MS medium with its macro nutrients reduced by half. Sodium hypochlorite at 30% for 15 min., gave best results of sterilization with 50% efficiency.

They were then placed onto MS basal medium containing a combination of growth regulators at different concentrations (BA at 5, 10, 15, or 20 μM), each with IBA or NAA at 0.5 μM, 30 g/l sucrose and solidified with 7 g/l Agar. pH was adjusted to 5.7 before autoclaving on 121 °c for 20 min. Multiplication rate of 4-folds was achieved every 4 weeks on MS medium supplemented with 5 μM BA+ 0.5 μM IBA, with 2.69 cm average shoot height. BA was superior with significant differences to Kin. at the same concentration which produced only 1.15 new shoots with 1.9 cm average height. Increasing BA concentration to 15 and 20 μM resulted in decreasing of shoot height. High BA concentrations also induced callus formation at shoot bases. However, shoots grown on media with Kin. had relatively bigger leaf surface but with decreasing shoot number. Average shoot number increased until sixth subculture with multiplication rate of 6 shoots every 4 weeks.

Rooting was achieved within 4 weeks by transferring 2-3 cm shoots onto MS agar-gelled media containing IBA at a conc. of 14.70 μM, with a maximum rooting efficiency of 45%.

Rooted plantlets were transplanted into pots with a mixture of 2:1 (v/v) peat: perlite and covered with plastic bags and acclimatized gradually to field conditions throughout 4 weeks. Acclimatized plantlets were transferred to greenhouse for further acclimatization before transplanted in the field with 60 % efficiency.

On the other hand, Randomly Amplified Polymorphic DNA (RAPD) technique was employed in the present study for identifying 27 wild hawthorn genotypes collected from 15 different areas around Damascus countryside and revealing their genetic relationships.

Leaves were collected from wild hawthorn trees for DNA extraction. The DNA isolation procedure was based on a CTAB method with a substantial modifications. Polymorphism of investigated genotypes was observed with 52 out of 64 tested RAPD primes which gave repeatable polymorphic product producing a total of 507 bands, 256 of them were polymorphic and 251 monomorphic. The level of polymorphism amounted to 48.37% with an average of 9.75 bands/primer and an average of 4.82 polymorphic bands/primer. Relationship was determined on the base of polymorphic products analysis and presented in form of dendrograms (UPGMA percent method).

There was no correlation between the genotypes which has close genetic relationship and the regions collected from, where samples of one region were distributed all over the dendrogram.

The current study contributes in preservation of biodiversity of hawthorn, where it enables characterization of genotypes and then propagating the valuable ones to extend their cultivation, especially because some of them are neglected and endangered by extinction.

المراجع

1.المراجع العربية

1- مزهر، بيان. 1998. **التنوع الحيوي للمصادر الوراثية لبعض الأشجار المثمرة في جنوب سوريا / درعا – السويداء/.** رسالة ماجستير. كلية الزراعة . جامعة دمشق. ص : 1-180 .

2- الريحاني، خالد. 2006. **الإكثار الخضري الدقيق لبعض أصول التفاح الهامة في القطر العربي السوري.** رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة حلب. ص : 1-128 .

3- العيسى، عماد، محمد حسني جمال. 2004. **تأثير بعض المعاملات في طرائق إكثار الزعرور *Crataegus spp*** . مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية. المجلد(20). العدد الأول.73-84

4- ديب، علي خليل. 2002. **توصيف وتقييم بعض طرز الزعرور *Crataegus azarolus L.* في محافظة اللاذقية.** مجلة جامعة تشرين للدراسات والبحوث العلمية. سلسلة العلوم الزراعية المجلد (24) العدد (12) .

5- ريا، لينا. 2005. **تصنيف الزعرور في المنطقة الشمالية الغربية من سوريا** . رسالة ماجستير. كلية الزراعة . جامعة تشرين. ص : 1- 174 .

6- ضميرية، سمر. 2001. دراسة **التنوع الحيوي للأنواع البرية من جنسي اللوز والزعرور في المنطقة الشمالية الغربية من ريف دمشق.** رسالة ماجستير. كلية الزراعة . جامعة دمشق. ص : 1- 175

7- فلوح، عصام. 1990. **الإجاص السوري وإمكانية استخدامه كأصل في إكثار أصناف الإجاص في القطر العربي السوري.** رسالة ماجستير. كلية الزراعة. جامعة دمشق. ص: 1- 131 .

8- قطنا، هشام. 1988. **الفاكهة متساقطة الأوراق.** منشورات جامعة دمشق. كلية الزراعة ص 111.

9- محفوض، محمد. 1982. **التفاحيات والكرمة.** منشورات جامعة تشرين. كلية الزراعة. ص 294 (241-242) .

2. المراجع الأجنبية

1. ABBOT, A. J. and WHITELEY, E. 1976. **Culture of *Malus* tissues *in vitro* I. Multiplication of apple plants from isolated shoot apices.** Scientia Hortic. 4: 83-189.
2. ABDUL KADER, A.M. 1992. ***In vitro* approach to the multiplication of horticultural crops**. Ph.D thesis. University of Horticulture and Food Industry, Budapest –Hungary.
3. ALBAROUKI, E. and PETEERSON, A. 2007. **Molecular and morphological characterization of *Crataegus* L. species (*Rosaceae*) in southern Syria**. Botanical Journal of the Linnean Society. 153: 255-263.
4. ARELLO, E. F. PASQUAL, M. and PINTO, J. E. 1991. **Benzylaminopurine in the *in vitro* propagation of the apple rootstock MM 111**. Revista Leres 38: 94-100.
5. AUTIO,W. R.,SCHUPP, J.R., FERREE, D.C., GLAVIN,R. and MULCACAHY, D.L. 1998. **Application of RAPDs to DNA extracted from apple rootstocks**. Hort. Science 33: 333-335.
6. BAHORUN, T., TROTIN, F., and VASSEUR, J. 1994. **Comparative polyphenolic productions in *Crataegus monogyna* callus cultures**. Phytochemistry, 37:1273-1276.
7. BAKER, M. L. 1991. **Increasing seed germination percentage of *Crataegus opaca* (mayhaw) by fermentation**. Hort Science, 26, 496.
8. BALTA, F. M. CELIK, F., TURKOGLU, N. OZRRENK, K. and OZGOKCE, F. 2006. **Some fruit traits of hawthorn (*Crataegus spp.)* genetic resources from Malatya, Turkey**. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, 2(6):531-536.
9. BOISSIER, E . 1872. **Flora Orientalis**. Volumen secundum . Amsterdam.
10. BOLAR, J. P., NORELLI, J. L . and ALDWINEKLE, S. 1998. **An efficient method for rooting and acclimatization of micropropagation apple cultivars**. Hort. Sci., 33(7): 1251-1252.
11. BOLAR, J. P., NORELLI, J. L and ALDWINEKLE, S. 1998. **An efficient method for rooting and acclimatization of micropropagation apple cultivars**. Hort. Sci., 33(7): 1251-1252.
12. BRAINERD, K. E. and FUCHIGAMI, L.H. 1981. **Stomatal functioning of *in vitro* and greenhouse apple leaves in darkness, manitol, ABA and CO2**. J. Exp. Bot. 33 : 388-392.
13. BRANISLAVA, G. and LJILANA, R. 1987. **Micropropagation of apple Rootstocks**. Acta Horticulturae. 212:589-594.
14. BRINKMAN, K. A. 1974. **Seeds of woody plants in United States**. Agric. Washington, DC: USDA Forest Service, 450: 56-60.

15. BROOME, O.C. and ZIMMERMAN, R.H. 1985. **culture of shoot Meristems: Fruit plants cell culture and somatic cell**. Genetics of plants .vol.I, chapter (14): 111-122.
16. BROWN, A.G. 1975. Apples. **Advances in fruit breeding**. Purdue University Press, West Lafayette, Ind. Pages: 3-37.
17. BUSH, E.W., JONHSON, C.E. and PAYNE, J.T . 1991 . **Commercial nursery production of *Crataegus opaca* in Louisiana** . proceedings of the Southern Nurserymen´s Association Research Conference , 36th Annual Report : 113-115
18. CHANG, W.T. DAO, J. and SHAO,Z.H. 2005. **Hawthorn: potential roles in cardiovascular disease**. Am. J. Chin. Med. (33):1-10.
19. **Characterization of five sour orange clones through molecular markers and leaf essential analysis**. Scientia Horticulturae, vol. 109(1):54-59.
20. CHONG, C. 1981. **Influence of high IBA concentration on rooting**. Proc .Int. plant prop. Soc. 31.
21. CHRISTENSEN, I. K. 1992. **Revision of Crataegus Sect. *Crataegus* and Nothosect *Crataeguineae* (*Rosaceae-Maloideae*) in the Old World. Systematic Botany Monographs**. The American Society of plant Taxonomists. University of Michigan Herbarium. Vol. 35:1-199.
22. DAI, H., ZHANG, Z., and GUO, X. 2007. **Adventitious bud regeneration from leaf and cotyledon explants of Chinese hawthorn *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major N.E. Br**. *In Vitro* Cell. Dev. Biol .43:2-8.
23. DEMIRAY, H. 2007. **Calcium oxalate crystals of some *Crataegus* (*Rosaceae*) species growing in Aegean region. Biologia**. Bratislava, 62/1: 46-50.
24. DIRR, M. A., and HEUSER, J. .1987. **The reference manual of woody plant propagation: from seed to tissue culture**. Athens, GA: Varsity press, 239.
25. DOWIDAR, A. E., LOUTFY, M. H., KAMEL, E.A., and HAFES, H. H. L., 2003. **Studies on the *Rosaceae* II- SDS-PAGE Seed Protein Electrophoresis and its Significance in the Taxonomy of the Family.** Pakistan Journal of Biological Sciences 6 (21): 1820-1829.
26. DUNEMANN, F. KAHNAU, R., and SHMIDT, H. 1994. **Genetic relationships in *Malus* evaluated by RAPD (fingerprinting) of cultivars and wild species**. Plant Breeding. 113: 150-159.
27. DUNSTAN, D., TURNER, I. and LAZAROFF, W. 1985. **Propagation *in vitro* of apple rootstock M4: Effect of phytohormones on shoot quality**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 4: 55-60.
28. ELLIOTT, R. R. 1972. **Axenic culture of shoot apices of apple**. N. Z. J. Bot. 10 : 254-258.
29. ERIG, A.C., and SCHUCH, M. W. 2003. **Evaluation of the genotypic fidelity by RAPD markers of in vitro regenerated pear shoots (*Pyrus communis* L.) cv. Carrick**. Cienc. Rural. V. 33. n.3.

30. FINESCHI, S., SALVINI, D., TURCHINI, D. and VENDRAMIN, G. G. 2005. ***Crataegus monogyna Jacq.* and *C. laevigata* (poir.) C. (*Rosaceae,Maloideae*) display low level of genetic diversity assessed by chloroplast markers**. Journal Plant Systematics and Evolution. 250: 187-196.
31. FORTE, A. V., IGNATOV, A. N., PONOMARENKO, V. V., DOROKHOV, D. B. and SAVELYEV, N. I. 2002. **Phylogeny of the *Malus* (Apple Tree) species, inferred from the morphological traits and molecular DNA analysis**. Russian Journal of genetics, vol. 38(10):1150-1161.
32. GONZALEZ, H. A., MARTINEZ, P. R. A. and CASTANO-TOSTADO, E. 2003. **Analysis of Low Chilling Apple (*Malus Spp.*) Populations from Central Mexico Based On Molecular Markers RAPD**. Acta Horticulturae 606:41-44.
33. GOULAO, L., CABRITA, L., OLIVEIRA , C. and LEITAO, J. 2001 . **Comparing RAPD and AFLP TM analysis in discrimination and estimation of genetic similarities among apple *(Malus domestica Borkh.*) cultivars**. Euphytica, Vol. 119 (3): 259 - 270.
34. HAAPLA, T. 2004. **Establishment and use of juvenility for plant propagation in sterile and non sterile conditions**. Department of Applied Biology, plant Breeding, university of Helsinki, Finland. 53 pp.
35. HARADA, T., MATSUKAWA, K., SATO, T., ISHIKAMA, R., NIIZEKI, M., and SAITO, K. 1993. **DNA-RAPDs detect genetic variation and paternity in *Malus*.** Euphytica 65, 87-91.
36. HARTMAN , T . H . 1975 . **Plant propagation . principles and practices** . prcnticc -Hall.Inc . England cliffs , New Jersey , 662 .
37. HARTMANN, T. H., KESTER, D. E., DAVIES, J. R., and GENEVE, R. L. 1997. **Plant propagation, principles and practices**. 6th ed. Upper Saddle River, NJ, prentice Hall, 770 pp.
38. HAUDHRY, B., YASMEEN, A., HUSNAIN, T., and RIAZUDDIN, S. 1999. **Mini-scale Genomic DNA Extraction from Cotton**. Plant Molecular Reporter 17: 1-7.
39. HAZIN, C. G., DILEK, Y., AYSE, D., ALIME, D., UMMUHN, G. G., and MUSA, G. 2006. **Effect of sowing date on germination rate in some hawthorn**. Suleyman Demirel Universiteesi, Fen Bilimleri Enstitusu Dergisi, 374-377.
40. HONG, H., SHIZHOU, H., and JINYU, D. 1987. **Clonal propagation of *crataegus scabrifolia* shoots apices *in vitro*.** Kunming Institute of Botany, Chines Acaddemy of Sciences, Kunming, 65-204.
41. HORMAZA, J.I. 2002. **Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats**. TAG Theoretical and Applied Genetics, vol. 104 (2-3): 321-328.
42. HOSSEINMEHR, S. J.; AZADBAKHT, M.; MOUSAVI, M. S.; MOHMODZADEH, A. and AKHLAGHPOOR, S . 2007. **Radioprotective Effects of Hawthorn Fruit Extract**

Against Gamma Irradiation in Mouse Bone Marrow Cells. Journal of Radiation Research. Vol (48): 68-163 .

43. HUTCHINSON,J.F. 1984. **Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple Norther Spy**. Scientia Horti. 22: 347-58.
44. HUTCHINSON, J. F. and ZIMMERMAN, R. H. 1987. **Tissue culture of temperate fruit and nut trees**. Hort. Rev. 9:273-349.
45. IANNACCONE, M., PALUMBO, D., VENTIMIGLIA, I., PATOCCHI, A., SPIGNO, P. and CAPPARELLI, R. 2007. **Use of molecular markers and flow cytometry to preserve ancient Annurca apple germplasm**. Biotechnology Letters, vol. 29 (2): 279-284.
46. JACCARD, P. 1908. **Nouvelles recherches sur la distribution flora**. Bull. Sac. Nat. 44: 223-270.
47. JAMES, D. J. and THURBON, I. J. 1979. **Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M.9**. J. Hortic. Sci. (54) : 309-311.
48. JONA, R. and. MENINI, U.G., 1987. **Tissue Culture of Selected Tropical Fruit Plants**. FAO and Agricultural Organization of the United Nations 79. 124 pp.
49. JONES, O. P. 1967. **Effect off benzyl adenine on isolated apple shoots**. Nature (London). 215: 1514.
50. JONES, O. P. 1986. **Endogenous growth regulators and rootstock scion interaction in apple and cherry**. Acta Hortic. 179: 177-184.
51. KAO, E. S.; WANG, C. J.; LIN, W.L.; YIN, Y.F.; WANG, C. P. and TSENG,T.H. 2005. **Anti-inflammatony potential of flavonoid contents from dried fruit of crataegus Pinnatifida *in vitro* and *in vivo*.** J. Agric. Food Chem. (53): 430-436.
52. KARHU, S. T. and ZIMMERMAN, R. H. 1993. **Effect of light and coumarin during root initiation of rooting apple cultivars *in vitro*.** Adv. Hortic. Sci.7:33-36.
53. KATAOKA, I. AND INOUE, H. 1993. **Micropropagation of java apple. Jpn**. J. Trop. Agr. 37 (3): 209-213.
54. KEYES, G. J., COLLINS, G. B. and TAYLOR, N. L. 1980. **Genetic variation in tissue cultures of red clover**. Theor. Appl. Genet. 58: 265-271.
55. KLERK, G.J., SMULDERS, R. and BENSCHOP,M . 1990 . **Basic peroxidases and rooting in microcuting of *Malus***. Acta Hort. (280):29-36.
56. KOGA, B., KUDO, T., ISHIYAMA, M., SUZUKI, M. and KON, T. 1998. **RAPD analysis of hybrid seedlings from a wild apomictic apple parental line**. Acta Horticulturae. 484:363-366.
57. KOLLER, B., LEHMAN, A., MCDERMOTT, J. M. and GRANGER, R. L. 1993. **Identification of apple cultivars using RAPD markers**. Theoretical and Applied Genetics 85(6-7): 901-904.
58. LANDRY, B. S., LI, R. Q., CHEUNG, W. Y. and GRANGER, R. L. 1994. **Phylogeny analysis of 25 apple rootstocks using RAPD markers and tactical tagging**. TAG Theoretical and Applied Genetics, Vol. 89(7-8): 847-852.

59. LANE, W. D. 1978. **Regeneration of apple plants from shoot meristem-tips.** Plant Sci Lett. 13: 281-285.
60. LANE, W. D. and MCDOUGALD. J. M. 1982. **Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin**. J. Plant Sci. 62: 689-694.
61. LIZARRAGA, R. A. JYASINGHE,U, and. DODDS, J. 1991. **Tissue culture for elimination of pathogens**. International Potato Center (CIP). Research Guide 3: 21 p
62. MAHLSTED, P. J. and HARBR, E. E. 1975. **Plant propagation**. John Willy and sons, INC. New York, 413.
63. MAJADA, J. P, SIERRA, M.I and SANCHEZ-TAMES, R. 2001. **Air exchange Cell rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation**. Sci. Hort. 87: 121–130.
64. MARGARET, E. N., and COLIN, R. N. 1986. **Change in shoot proliferation *in vitro* subculture of shoots of woody species of *Rosaceae*.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 5: 187-197.
65. MARKS, T. R., and SIMPSON, S. E. 1999. **Effect of irradiance on shoot development *in vitro*.** Plant Growth Regulation, 28: 133-142.
66. MARRIN, J. A., JONES, O. P., and HADLOW, W. C. 1993. **Micropropagation of columnar apple trees**. Hort. Sci. 68: 289–297
67. MODGIL, M. SHARMA, D. R. and BHARDWAJ, S. V. 1999. **Micropropagation of apple cv. Tydeman N, S Early Worcester**. Scientia Horticulturae 81 :179-188.
68. MODGIL, M., MAHAJAN, K., CHAKRABARTI, S. K., SHARMA, D. R. and SOBTI, R. C. 2005. **Molecular analysis of genetic stability in micropropagated apple rootstock MM106**. Scientia Horticulturae, vol. 104 (2):151-160.
69. MORGENSON, G. 2000. **Effects of cold stratification, warm-cold stratification, and acid scarification on seed germination of three *Crataegus* species**. Tree Planter's Notes, 49(3): 72-74.
70. MOUTERDE, P . 1966 . **Nouvelle Flore Du liban et de la Syrie** . Tom second . (Text) . Dar El – Mashreq Editeurs, m Beyrouth, m Liban .
71. MULCAHY, D. L., CRESTI, M. SANSAVINI, S, DOUGLAS, G. C., LINSKENS, H. F., MULCAHY, G. B., VIGNANI, R. and PANCALDI, M. 1993. **The use of random amplified polymorphic DNAs fingerprint apple genomes**. Sci USA. 76: 5269-5273.
72. MURASHIGE, T. and SKOOG, F. 1962. **Arvised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures.** Physiol Plant. 15: 473 - 497.
73. MUZHER, B.M. 2004. **Application of biochemical and PCR based molecular markers to the characterization of Syrian pears (*Pyrus syriaca* Boiss) genotypes**. Ph.D. Degree in Agricultural Science. Cairo University. pp:1-108.
74. NANDI, S. K, LETHAM, D. S., PALNIL, M. S., WONG, O. C. and SUMMONS, R. E. 1989. **6-Benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins.** Plant Sci. 61: 189–196.

75. NORDSTROM, A. C. and ELIASSON, L. 1986. **Uptake and translocation of C14-labeled benzylaminopurine in apple shoots grown *in vitro* in relation to shoot development**. Physiol Plantarium., 68(3): 431-435.
76. OKAMURA, T., AKINO, R., and OHFUKA, Y. 1999. **Induction of callus from *Crataegus cuneata* stems**, Bull. Mukogawa Women,s Univ. Nat. Sci., 47: 43-45.
77. OLIVEIRA, C. M., MOTA, M., MONTE-CCORVO, L., GOULAO, L. and SILVA, D. M. 1999. **Molecular typing of *Pyrus* based on RAPD markers**. Scientia Horticulturae, Vol. 79 (3-4): 163-174.
78. PABOT, H . 1956 . **Natural vegetation for Syrian regions** . Ministry of Agriculture . Syria .
79. PASQALETTO, P. L. ZIMMERMAN, R. H. and FORDHAM, I. 1986. **Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of Gala apple *in vitro*.** J. Amer . Soc. Hort. Sci. 111(6): 976-980.
80. PASQUALE, D. F., SIRAGUSA, M., ABBATE, L., TUSA, N., PASQUALE, D.C. and ALONZO, G. 2006. Characterization of five sour orange clones through molecular markers and leaf essential analysis. Scientia Horticulturae, vol. 109 (1): 54-59.
81. PAYNE, J.A., KREWER, G.W., and FITENMILLER, R.R. 1990. **Mayhaws: trees of pomological and ornamental interest.** Hort Science. (25): 246-375.
82. PERES, S. R., RUIZ, D., DICENTA, F., EGEA, J. and GOMEZ, M. P. 2005. **Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships**. Scientia Horticultrae, vol. 103 (3): 305-315.
83. PERRIER, X. and JACQUEMOUD-COLLET, J.P. 2006. **DARwin software**. http://darwin.cirad.fr/darwin .
84. PEVALEK-KOZLINA, B. and JELASKAS, S., 1987. **Microclonal Propagation of *Prumus avium* L.** Acta Hort., 212: 599-601.
85. PICCIONI, E ., and STANDARDI , A . 1995. **Encapsulation of micropropagation buds of six woody species**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 42, 221-226.
86. PIERIK, R. L. M. 1987. ***In vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks**. Hort. Science. 15 (5): 597 - 598.
87. POST, G.E . 1896 . **Flora of Syria, Palestine and Sinai**. Vol (2),second edition. American University of Beirut, Lebanon.
88. PUA, E. C., CHONG, C. and ROUSSELLE, G. L. 1983. ***In vitro* propagation of Ottawa3 apple rootstock. Can**. J. Plant Sci. 63: 183-188.
89. QRUNFLCH, M. M. 1994. **Studies on the hawthorn (*Crataegus azaralus*): III. Potential rootstock for Golden delicious apple and Williams pear**. Horticultural Science 69 (1) 1-4

90. RAJESH, K., AND BIST, L. D. 2002. **Micropropagation of hawthorn *Crataegus oxyacantha* Linn through shoot tip culture**. Indian Journal of Horticulture, 4: 435-439.
91. RAKOTOARISON, D. A., GRESSIER, B., TROTIN, F., BRUNET, C., DINE, T., LUYKX, M., VASSEUR, J., CAZIN, M., CAZIN, J. C., and PINKAS, M. 1997. **Antioxidant activities of polyphenolic extracts from flowers, in vitro callus and cell suspension cultures of *Crataegus monogyna*.** Pharmazie, 52(1): 4-60.
92. RECHINGER, K . H . 1969 . **Flora Iranica**. Akademisch Druck . Verlagsantalt , Graz – Austria .
93. ROYO, B. J. and ITOIZ, R. 2004. **Evaluation of discriminance capacity of RAPD, isoenzymes and morphologic markers in apple (*Malus x domestica* Borkh.) and the congruence among classifications**. Genetic Resources and Crop Evolution, vol. 51(2):153-160.
94. SARWAR, M., SKIRVIN, R. M., KUSHAD, M. and NORTON, M. A. 1998. **Selecting dwarf apple (*Malus domestica* Borkh.) trees *in vitro*: multiple cytokinin tolerance expressed among three strains of 'McIntosh' that differ in their growth habit under field conditions**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 54: 71–76.
95. SCHILIRO, E., PREDIERI, S. and BERTACCINI, A. 2001. **Use of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic variation in *Pyrus* species**. Plant Molecular Biology Report. 19: 271 a-h.
96. SHARIFANI, M. M. and JACKSON, J. F. 2002. **Characterization of pear species and cultivars using RAPD primers**. Acta Horticulturae. 538: 499 - 504.
97. SHIZHOU, H., AIQIN, L., HONG, H. and JINYU, D. 1987. **Ways of enhancing the rooting rate of the *in vitro* culture shoots from adult *Crataegus scabrifolia* trees. Kunming Institute of Botany**, Chines. Academy of Sciences, Kunming.
98. SKIRVIN. R. M. 1981. ***In vitro* propagation of thornless trailing blackberries**. Hort Sci. 16:310-312.
99. SNGHA, S. 1980. ***In vitro* propagation of Seckel pear**. Prod Fruit Plant Tiss. Cult. Apple. Feasibility. USDA-SEA, ARRNE-II, Washington, pp: 59-63.
100. SNIR, I. and Eres, A. 1980. ***In Vitro* propagation of Malling Merton apple rootstocks**. Hortic. Sci.15: 597-598.
101. SRISKAND ARJAH, S., SKIRVIN, R. M., ABU-QAOUD, H., and KORBAN, S. S. 1990. **Factors involved in shoot elongation and growth of adventitious and axillary shoots of three apple scion cultivars *in vitro*.** J. Hort. Sci. 65: 113–121.
102. THIS, P., CUISSET, C. and BOURSIQUIT, J. M. 1997. **Development of stable RAPD markers for the identification of grapevine rootstocks and the analysis of genetic relationships**. Am. J. Enol. Vitic. 48 (4): 492-501.

103. TIPTON, J. L., and PEDROZA, G. 1986. ***Crataegus tracyi* Ashe: seed germination response to scarification treatment combinations**. Plant Propagator, 32(1): 3-5.

104. TOWNSEND and GUEST, E . 1966. **Republic of Iraq , Ministry of Agriculture, Baghdad, Flora of Iraq** . Volum (2).

105. TRANCRED, S. J., ZEPPA, A. G. and GRAHAM, G. C. 1994. **The use of the PCR-RAPD technique in improving the plant variety rights description of anew Queensland apple (*Malus domestica*) cultivar.** Australian Journal of Experimental Agriculture 34 (5): 665-667.

106. VALLS, J., RICHARD, T., TROTIN, F., MONTI, J. P., MERILLON, J. M., and Vitrac, X. 2007. **Carbon – 14 bio-labeling of flavanols and chlorogenic acids in *Crataegus monogyna* cell suspension cultures**. Food Chemistry, 105: 879-882.

107. VERBYLAITE, R., FORD-LIOYD, B., and NEWBURY, J. 2006. **The phylogeny of woody *Maloideae* (*Rosaceae*) chloroplast trnL-trnF sequence data**. BIOLOGIJA. Nr. 1. P: 60-63.

108. WAWROSCH, C., PRINZ, S., SOLEINNYNY, Y., and KOPP, B. 2007. **Clonal propagation of *Crataegus monogyna* Jacq. (Lindm.).** Planta Med.: 73.

109. WEBSTER, C. A., and JONES, O. P. 1991. **Micropropagation of some cold hardy dwarfing rootstocks for apple**. J. Hortic. Sci. 66:1-6.

110. WELSH, J. and MCCLELLAND, M. 1990. **Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers.** Nucleic Acid Res. 18: 7213-7218.

111. WILLIAMS, J. G. K., KUBELIK, A. R., RAFALSKI, J. A. and TINGEY, S.V. 1990. **DNA polymorphisms amplified by arbitray primers are useful as genetic markers**. Nucleic Acid Res. 18: 6231-6235.

112. YAE, B., KO, K., 1995. **Classification of *Malus domestica* cultivars by random amplified polymorphic DNA markers.** J. Korean Soc. Hortic. Sci. 36: 824-828.

113. YOUNG, J. A., and YOUNG, C. G. 1992. **Seeds of woody plants in North America, revised and enlarged edition**. Portland, OR: Dioscorides press, 407.

114. ZHOU, Z. Q. and LI, Y. N. 2000. **The RAPD evidence for the phylogenetic relationship of the closely related species of cultivated apple**. Genetic Resources and Crop Evaluation, vol.47 (4):353-357.

115. ZIV, M. 1991. **Quality of micropropagated plants – vitrification**. *In Vitro* Cell. Dev. Biol. 27: 64–69.

116. ZOHARY, M . 1972 . **Flora Palaestina** .Vol.(2). The Israel academy of science and humanities. Jerusalem .



الملاحق

ملحق (1) المختصرات العلمية الواردة في الأطروحة

1. الأوساط الغذائية

الاسم	الاختصار	الاسم الانكليزي
وسط موراشيج وسكوغ	MS	Murashige and Skoog (1962)
وسط شينك هلدبراندت	SH	Schenk and Hilderbrandt (1972)
وسط الأنواع النباتية الخشبية	WPM	Woody Plant Medium
وسط نيتش	N6	Nitsch Medium 1969
	DKW	Driver and Kuniyuki
وسط لينس ماير وسكوغ	LS	Linsmeir and Skoog

2. السيتوكينينات

الاسم	الاختصار	الاسم الانكليزي
بنزيل أدينين	BA	Benzyladenine
كينيتين	Kin	Kinetine
ايزوبنتيل أدينين	2ip	Iso- pentenyladenine
زياتين	Zea	Zeatin
ثيديازورون	TDZ	Thidiazuron

3. الأوكسينات:

الاسم	الاختصار	الاسم الانكليزي
اندول حمض الخل	IAA	Indol -3-acetic acid
اندول حمض الزبدة	IBA	Indol-3- butyric acid
نفتالين حمض الخل	NAA	Naphthalene acetic acid
دي كلوروفينوكسي حمض الخل	2,4-D	2,4 -Dichlorophenoxy acetic acid

4. الجبريلينات:

الاسم	الاختصار	الاسم الانكليزي
حمض الجبرلين	GA_3	Gibbrelic acid

5. مركبات أوساط أخرى:

الاسم	الاختصار	الاسم الانكليزي
فحم منشّط	AC	Activated charcoal

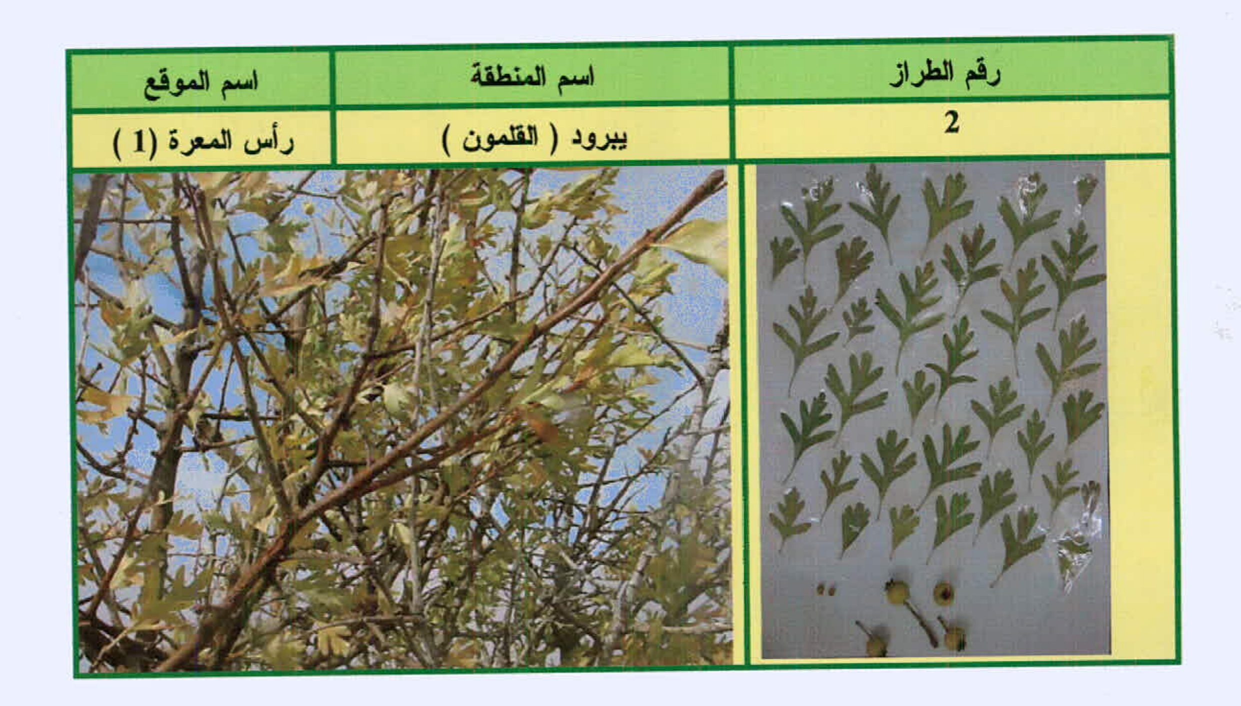
6. المصطلحات والمختصرات الخاصة بالتوصيف الجزيني الواردة في الأطروحة

الاسم الانكليزي	الاختصار	الاسم
Random Amplified Ploymorphic DNA	RAPD	تقنية التباينات الناتجة عن التضخيم العشوائي لقطع الـDNA
Microsllite Simple Sequence repeat	SSR	تقنية القصيرة (البسيطة المتكررة)
Ploymersae Chain Reaction	PCR	تفاعل البلمرة المتسلسل / التفاعل السلسلي للبوليمراز
Primer		مرئس
Cluster analysis		التحليل العنقودي
Polymorphic band		حزم متباينة (قطع DNA متباينة)
Dissimilarity		عدم التشابه
Genetic similarity		التشابه الوراثي
Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages	UPGMA	طريقة UPGMA
Jaccard coefficient		معامل Jaccard
Markers		معلمات / مؤشرات
Agarose gel		هلامة اغاروز
electrophoresis		الرحلان الكهربائي

الملحق (2) الطرز البرية للزعرور المستخدم في التوصيف الجزيئي

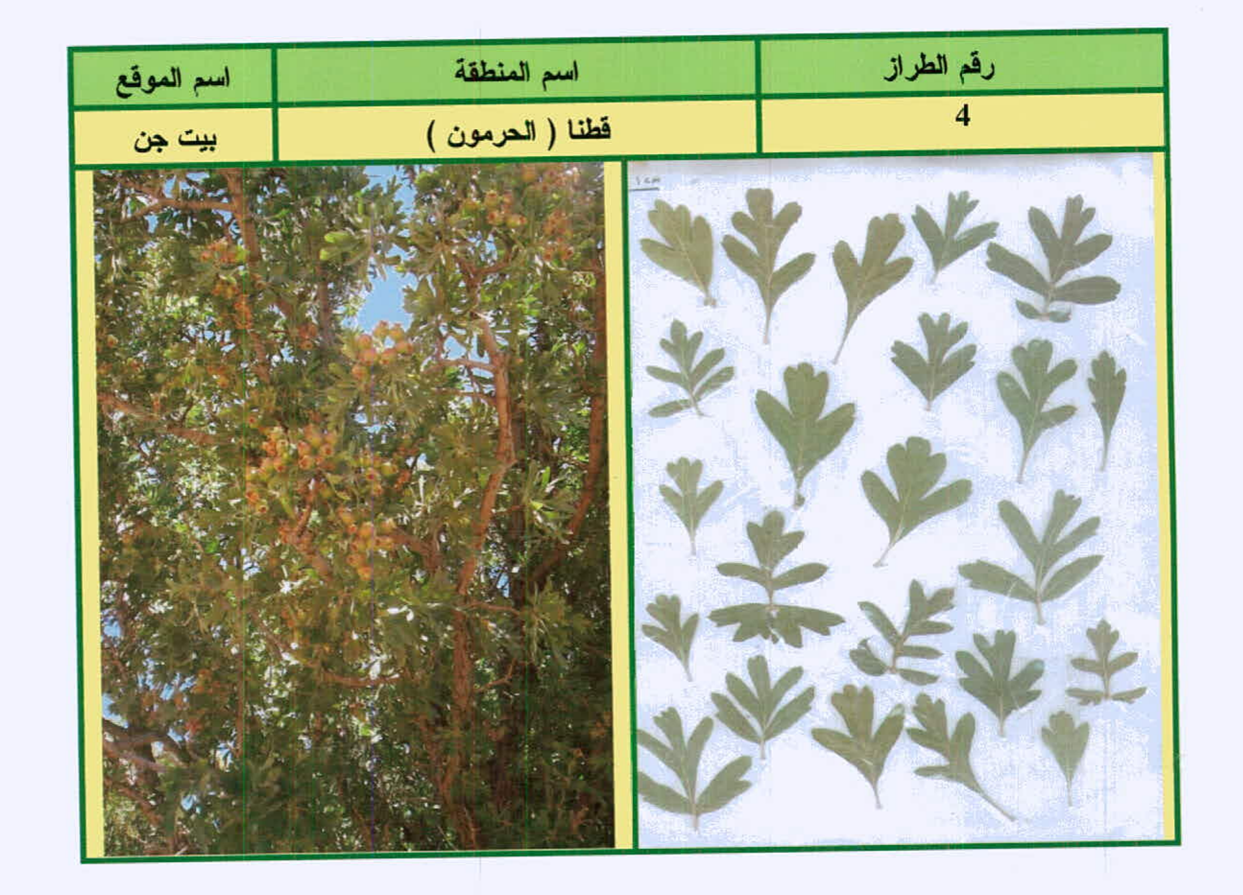
رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
1	الزبداني (جبال لبنان الشرقية)	جديدة يابوس

رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
2	يبرود (القلمون)	رأس المعرة (1)



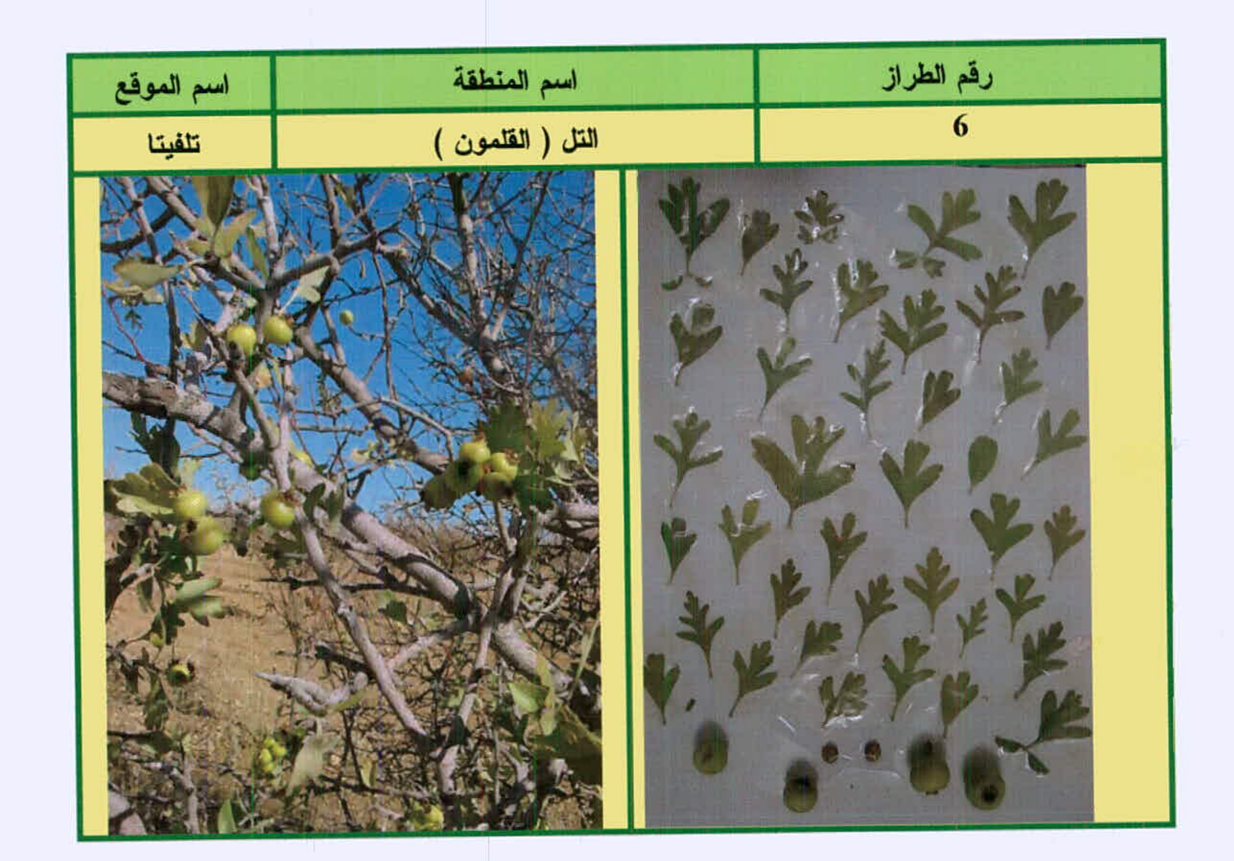
رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
3	الزبداني (جبال لبنان الشرقية)	سرغايا

رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
4	قطنا (الحرمون)	بيت جن



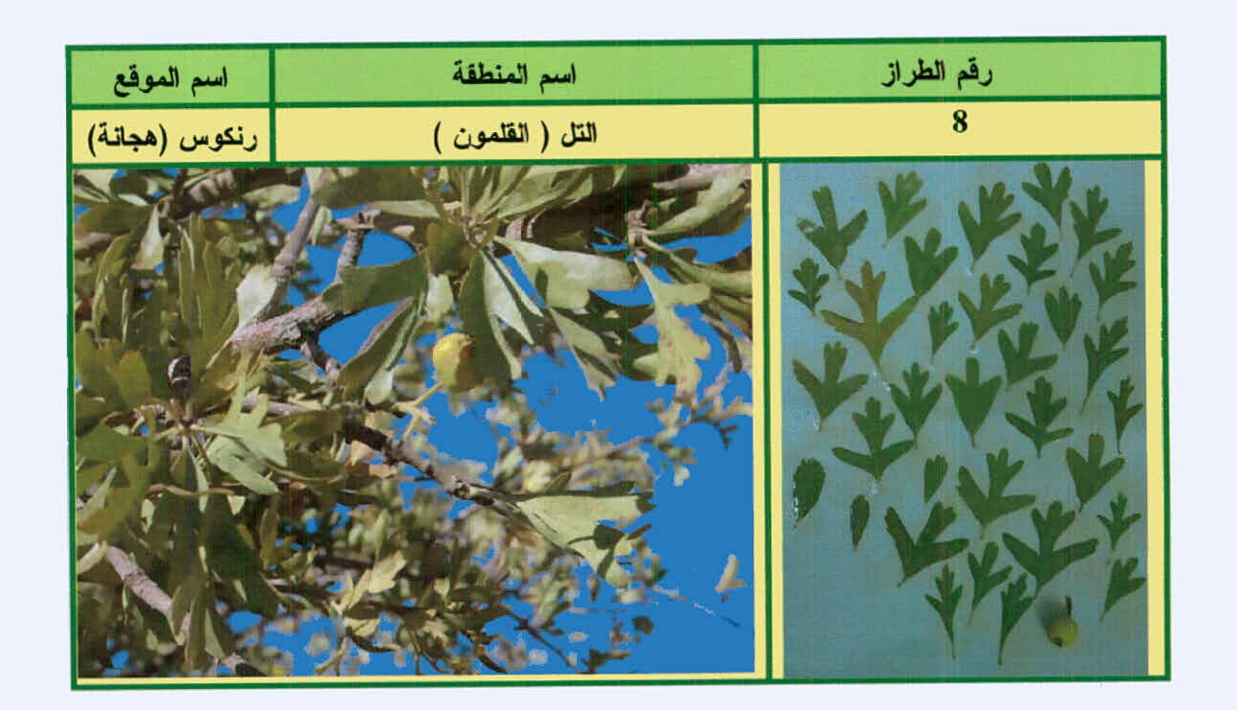
رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
5	الزبداني (جبال لبنان الشرقية)	تكية

رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
6	التل (القلمون)	تلفيتا



رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
7	يبرود (القلمون)	عسال الورد

رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
8	التل (القلمون)	رنكوس (هجانة)

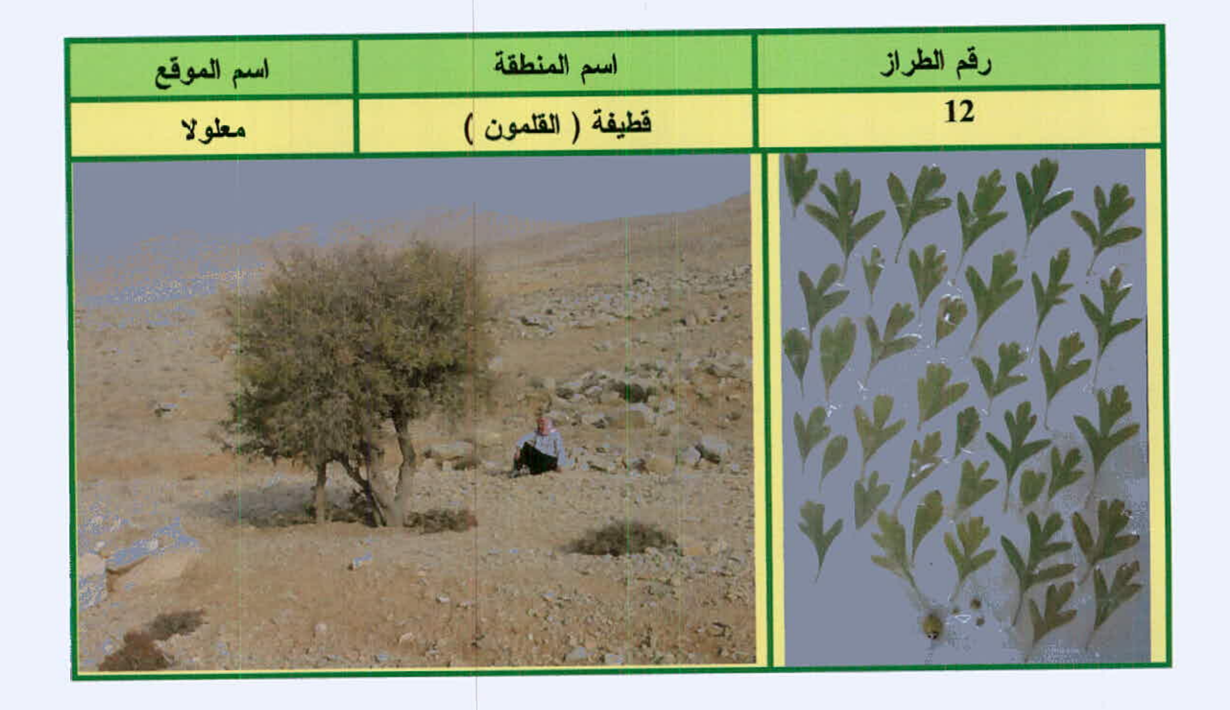


رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
9	النبك (القلمون)	المشرفة (2)

رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
10	النبك (القلمون)	قارة (وادي الشيخ علي)

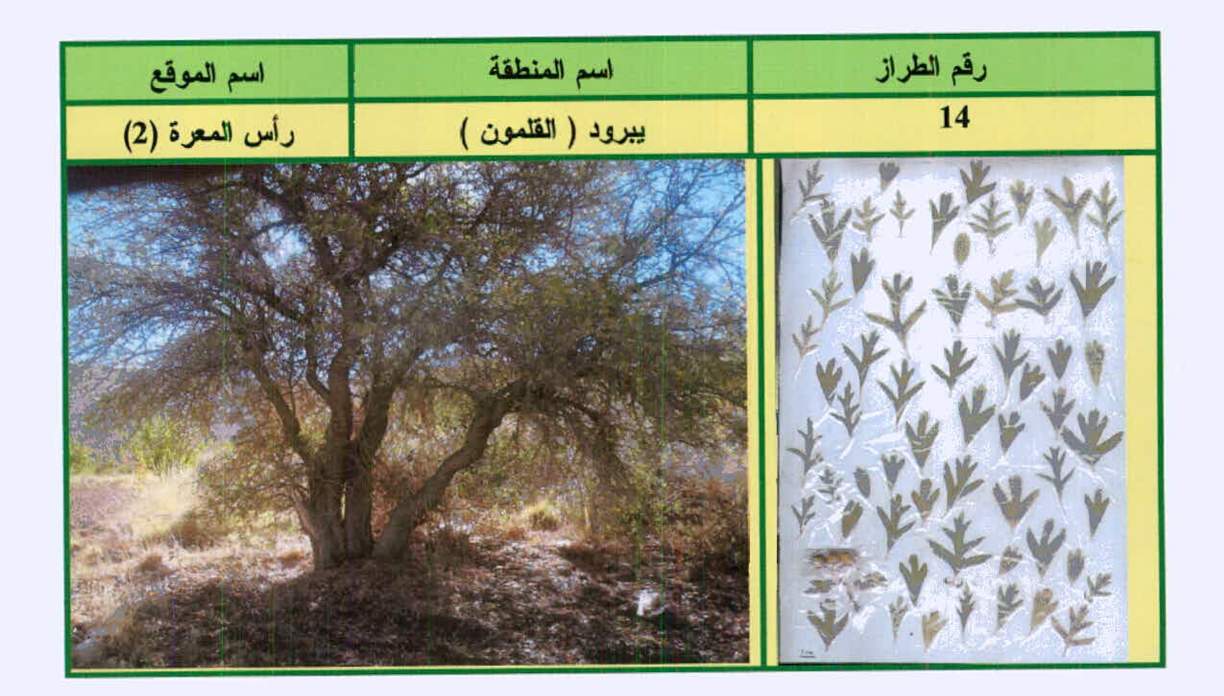
رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
11	التل (القلمون)	رنكوس (عرعورة 2)

رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
12	قطيفة (القلمون)	معلولا



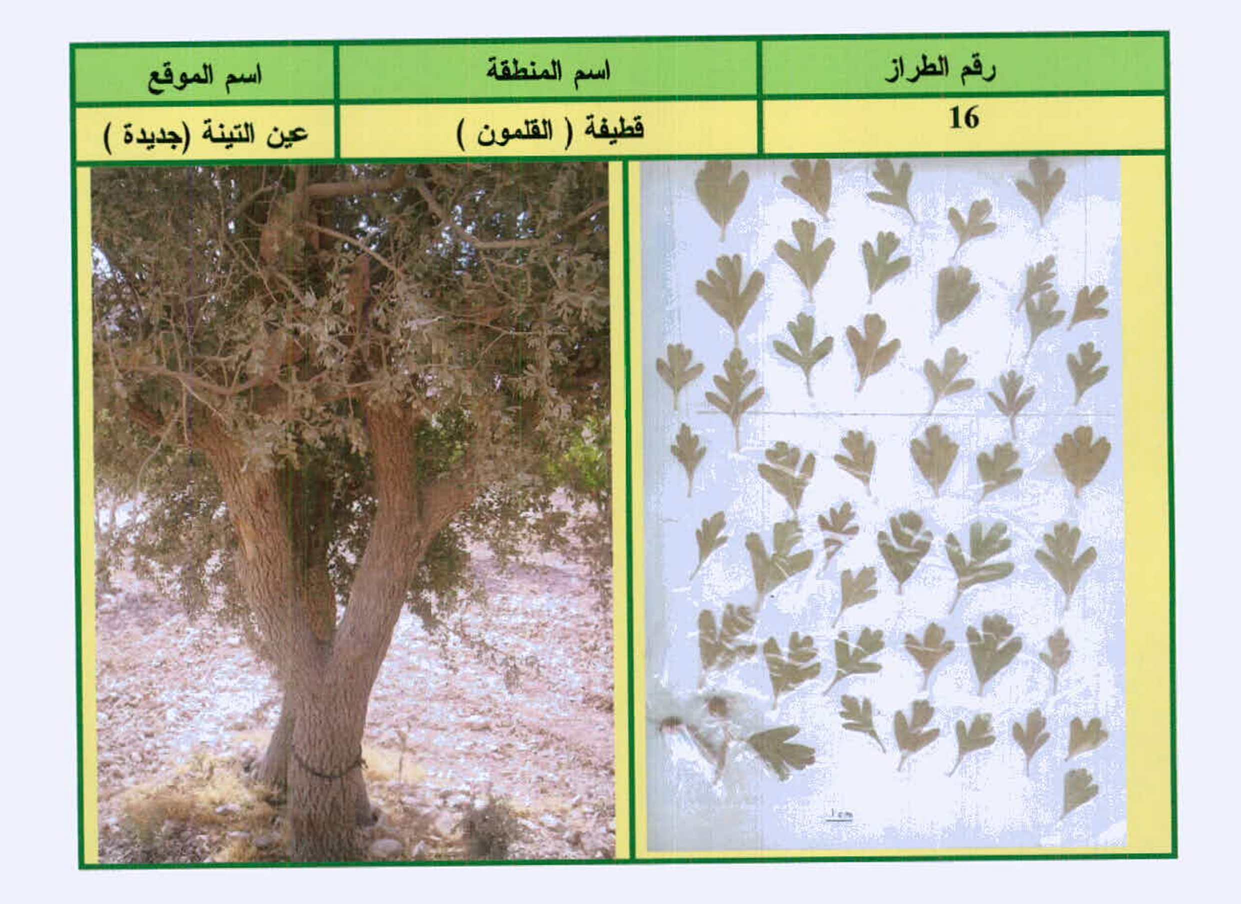
رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
13	النبك (القلمون)	قارة (شعبة الزعرور)

رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
14	يبرود (القلمون)	رأس المعرة (2)

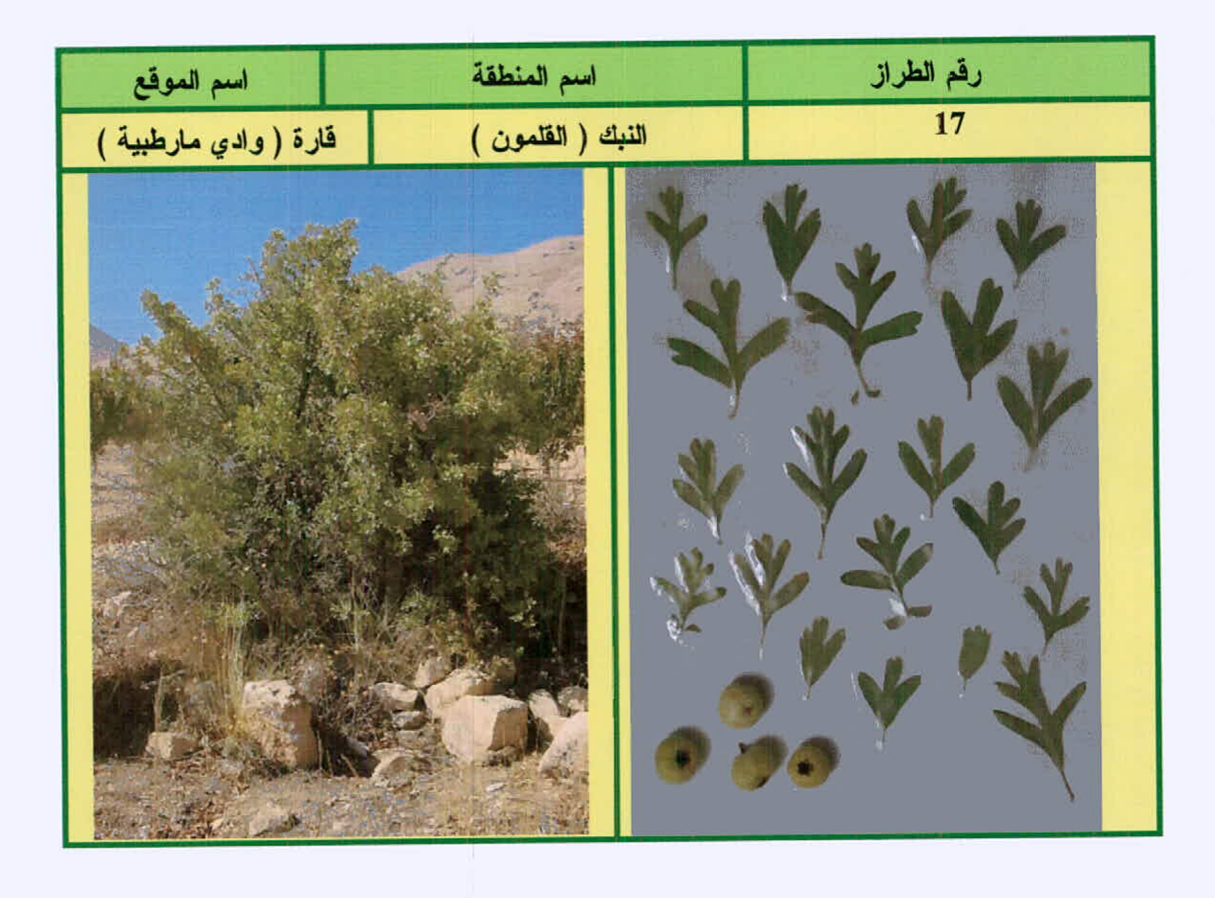


رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
15	النبك (القلمون)	قارة (وادي القصيرة)

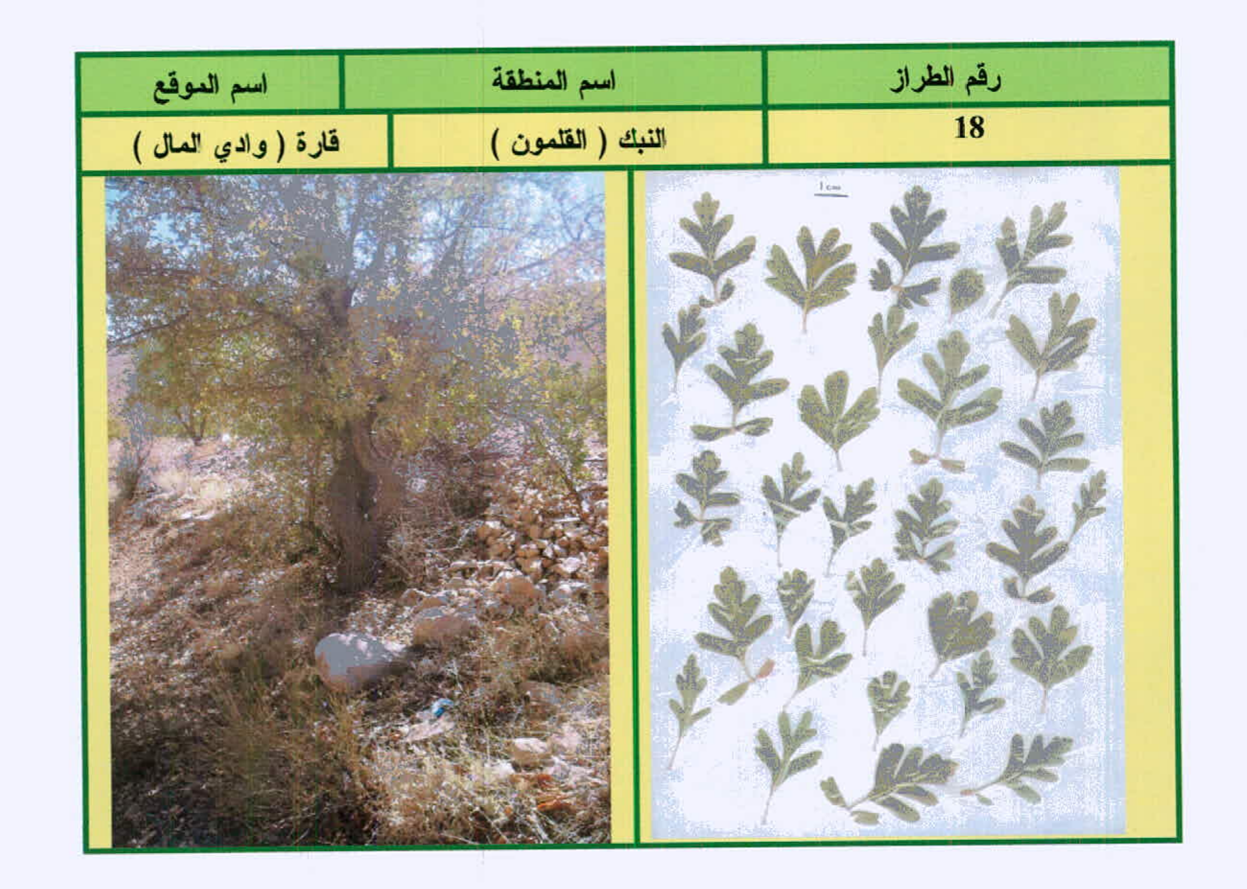
رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
16	قطيفة (القلمون)	عين التينة (جديدة)



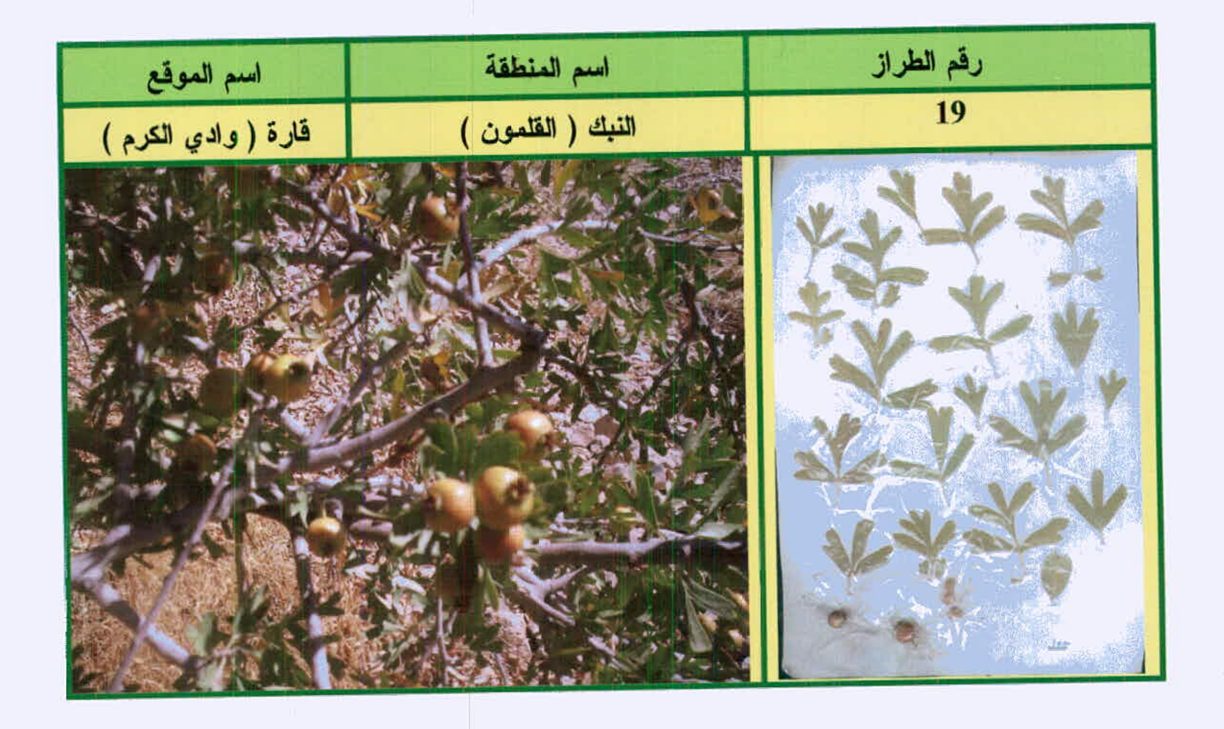
رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
17	النبك (القلمون)	قارة (وادي مارطبية)



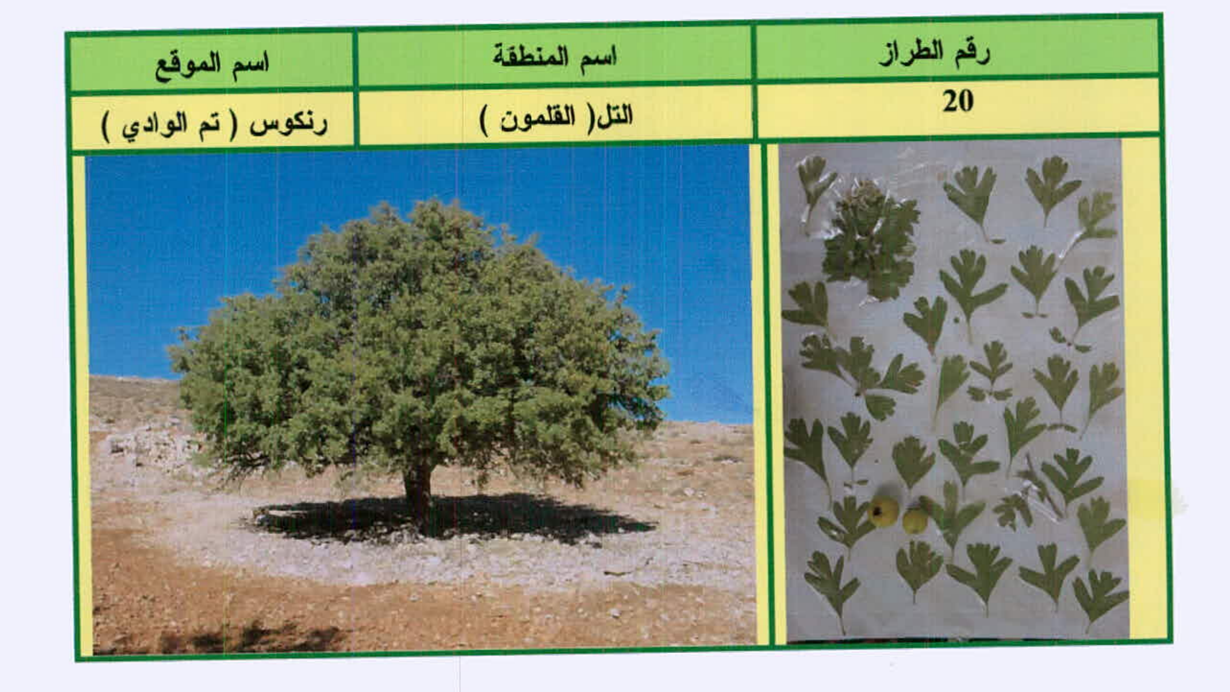
رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
18	النبك (القلمون)	قارة (وادي المال)



رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
19	النبك (القلمون)	قارة (وادي الكرم)

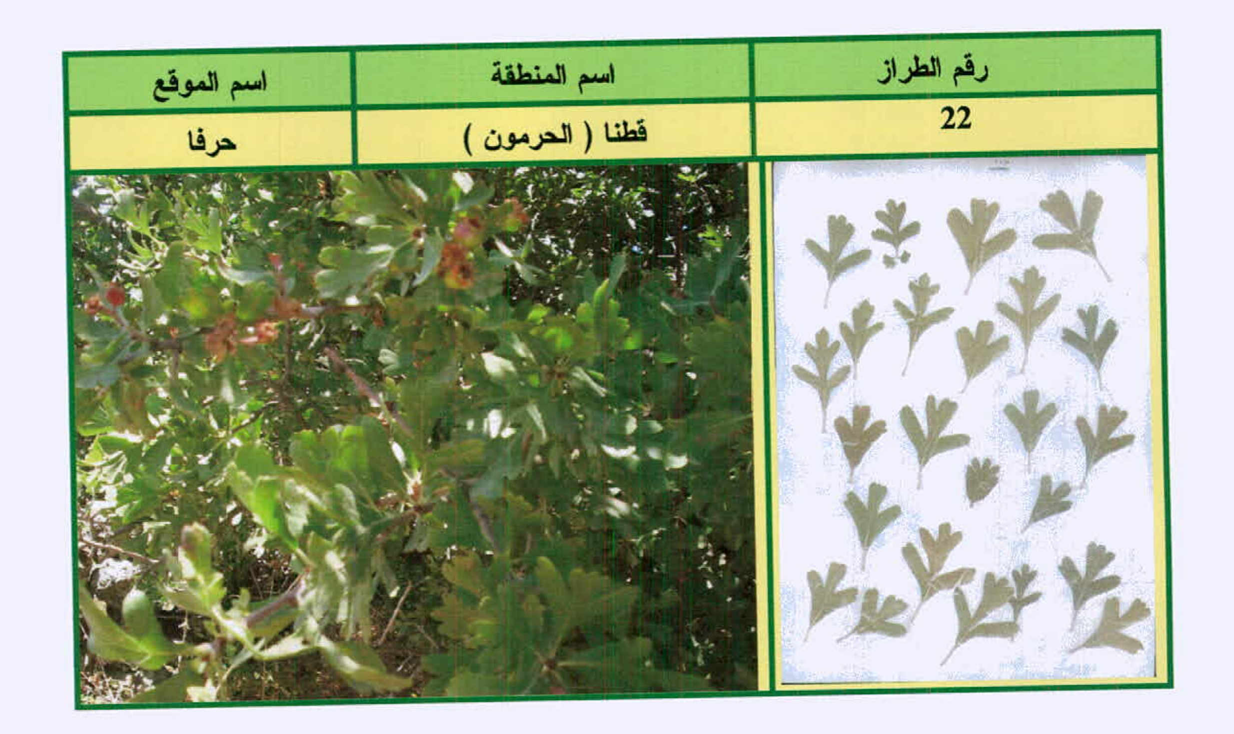


رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
20	التل(القلمون)	رنكوس (تم الوادي)



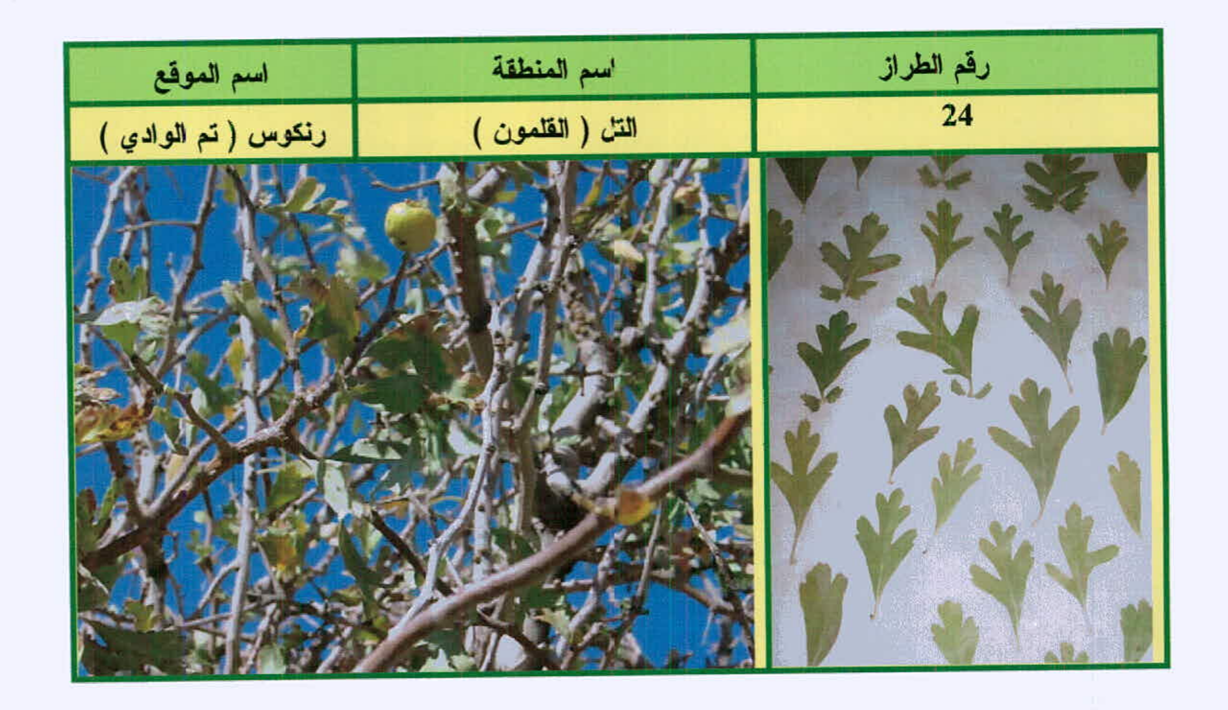
رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
21	التل (القلمون)	رنكوس (وادي قرنة)

رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
22	قطنا (الحرمون)	حرفا



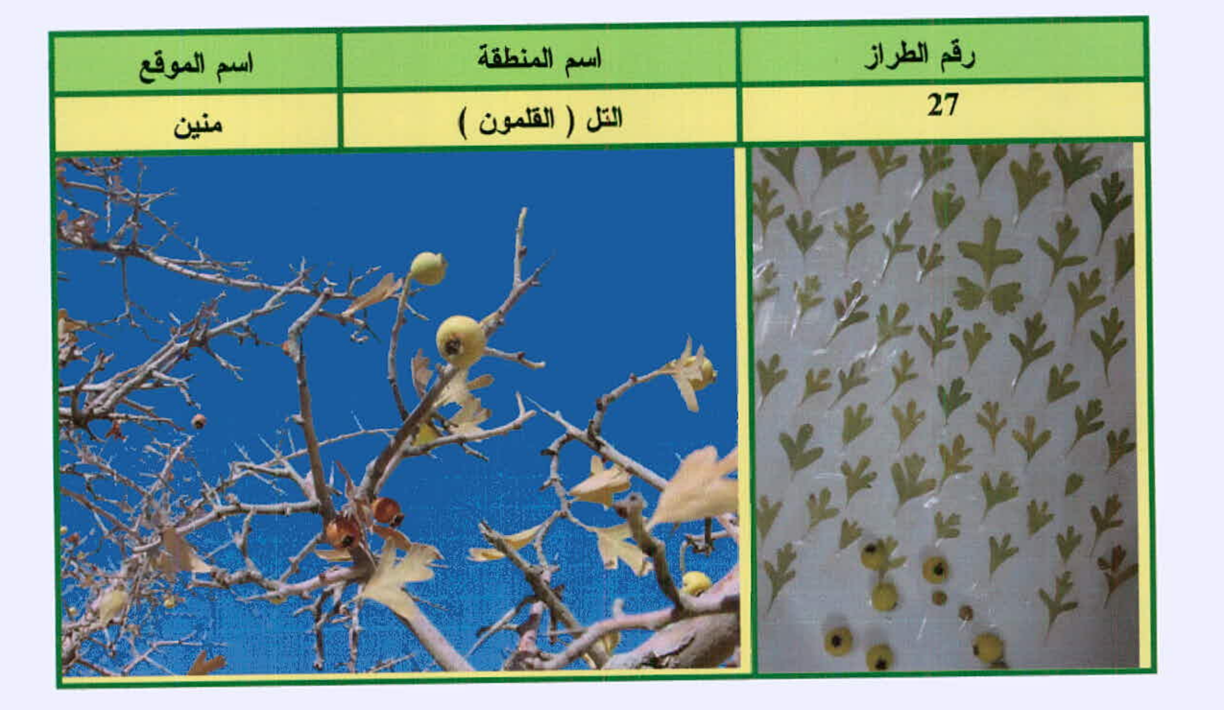
رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
23	التل (القلمون)	رنكوس (سبنا)

رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
24	التل (القلمون)	رنكوس (تم الوادي)



رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
25	التل (القلمون)	رنكوس (عرعورة 1)

رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
26	يبرود (القلمون)	الصرخة



رقم الطراز	اسم المنطقة	اسم الموقع
27	التل (القلمون)	منين

ملحق (3) بعض أنواع الزعرور الجديدة التي تواجدت في ريف دمش إضافة للنوع المدروس

